15 med

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Hamburg
Direktor: Professor Dr. med. C. Krauspe

Die Wirkung von Endoxan auf die Hämopoese der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Dietrich J. J. Faßbender
aus Itzehoe

Hamburg 1961

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Hamburg
Direktor: Professor Dr. med. C. Krauspe

Die Wirkung von Endoxan auf die Hämopoese der Ratte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Dietrich J. J. Faßbender
aus Itzehoe

Hamburg 1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der
Universität Hamburg am: 3.3.1961

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

Dekan:	Professor Dr. med. R. Prévot
Referent:	Dozent Dr. med. G. Pliess
Korreferent:	Professor Dr. med. C. Krauspe

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	Seite
1) Pharmakologische Charakterisierung von Endoxan	1
2) Wirkungsmechanismus des N-Lost	1
3) Störung des Fermentmechanismus durch N-Lost-Verbindungen	2
4) N-Lost-Verbindungen und Eiweißsynthese	3
5) Die Wirkung von N-Lost-Verbindungen auf die Chromosomenstrukturen	4
6) Beeinflussung des neuroendokrinen Systems durch N-Lost-Verbindungen	4
7) Allgemein biologische Wirkung der N-Lost-Verbindungen	6
8) Der karzinolytische Effekt der N-Lost-Derivate	7
9) Therapeutische Anwendung	7
Fragestellung der eigenen Untersuchung	8
Material und Methodik	9
Ergebnisse	
1) Allgemeinverhalten der Tiere	12
2) Sektionsbefunde	12
3) Verhalten des peripheren Blutes	13
4) Knochenmarksauszählung	16
5) Histologische Befunde des Knochenmarks	20
6) Zytomorphologisches und zytochemisches Verhalten der neutrophilen Leukopoese	22
7) Zytochemische Veränderungen der eosinophilen Reihe der Leukopoese	28
8) Zytochemisches Verhalten der Erythroblasten	28
9) Histologische Organbefunde	29
Diskussion	33
Zusammenfassung	46
Literaturverzeichnis	48
Nachwort	55
Lebenslauf	56

Einleitung

Endoxan (B 518 Asta), ein zyklischer N-Lost-Phosphamidester, ist ein Zytostatikum, dem das Prinzip zugrunde liegt, eine nicht-toxische Transportform erst in vivo, speziell im Tumorgewebe, unter dem Einfluß der hier angereicherten Fermente in eine toxische Wirkform überzuführen (9).

Im Tierversuch ist Endoxan bei der Behandlung verschiedener Impftumoren durch eine geringe leukotoxische Wirkung bei großer therapeutischer Breite pharmakologisch charakterisiert (1).

So beträgt der therapeutische Index im Therapieversuch am Yoshida-Ascitessarkom 8, 5. Er liegt damit im Vergleich mit N-Oxyd-Lost (2, 2) und B 485 (0, 8) außerordentlich günstig.

Die in 50 % curative Dosis beim Yoshida-Ascites-Sarkom der Ratte ist nur mit 0, 005 % "leukotoxischer Wirkungswahrscheinlichkeit" belastet, während sie beim N-Oxyd-Lost 1 % beträgt. Zur vollständigen Heilung des Yoshidasarkom, Walker-256-Carcinom und des Jensensarkom (von der Größe 20 g, 1 g und 5 g für die einzelnen Tumoren) ist eine curative Dosis erforderlich, die nur 2 - 4 % der minimal-letalen Dosis ausmacht (1).

Der spezielle Wirkungsmechanismus, der dieser karzinolytischen Wirkung zugrunde liegt, ist weder bei Endoxan noch beim N-Lost restlos geklärt.

Zu seiner Abklärung liegen viele Untersuchungen vor, die die Wirkung des N-Lostes teils durch eine Fermentinaktivierung, teils durch eine Chromosomenschädigung zu erklären versuchen. So vermuten Iversen und Kjerulf-Jensen (zitiert bei 49), daß N-Lost im Körper ein Chloration abgibt. Es bildet sich ein Äthylring, der einen Valenzwechsel des Stickstoffatoms zu einem quaternären Ammoniumkation nach sich zieht, das einen toxischen Einfluß auf die Fermentsysteme ausübt. Diese Ver-

mutung wird durch die Untersuchungen von Preussmann (44) gestützt, der einen deutlichen Zusammenhang zwischen Chlorabspaltbarkeit und therapeutischer Wirkung fand. Nach anderen Autoren (Barron, Barlett, Miller, Fruton, Stein und Bergmann und Goldeck zitiert bei 49) besitzt diese quaternäre Ammoniumgruppe große Affinität zu den wichtigen biologische Gruppen wie z.B. zu den Amino- und Sulfhydrilgruppen der Aminosäuren und zu den Amino- und Carboxylgruppen der Peptidketten.

Neben diesen zahlreichen Reaktionsmöglichkeiten von N-Lost mit chemisch aktiven Gruppen konnten speziell folgende Wirkungen von Stickstofflost auf den Zellstoffwechsel und auf das Neuroendokrinium beobachtet werden:

1. Störung des Fermentmechanismus

Colter und andere (zitiert nach 35, 49) konnten nachweisen, daß N-Lost irreversibel die Cholinoxydase- und Cholinazetylasesysteme hemmt. Auf diese Art und Weise könnte eine weitere Umwandlung des Cholins (Transmethylierung) in andere Methylakzeptoren wie Methionin verhindert werden (56). Ebenso konnte in vitro eine Hemmung der Katalase beobachtet werden (37). Hinsichtlich der Gewebsatmung konnte Barron (zitiert nach 49) an Gewebsschnitten von Milz, Gehirn und Nieren eine Atemhemmung bei N-Lost-Einwirkung nachweisen, wobei nach Goldeck (zitiert nach 49) die Oxydation der Brenztraubensäure und der l-Aminosäuren gestört ist.

Miller (36) dagegen fand, daß die aerobe Glykolyse der Thymuslymphozyten durch Methyl-bis(Beta-chloräthyl)amin = HN2 gesteigert wird. Der Glykogengehalt der Leberzellen nimmt durch N-Oxyd-Lost ab, was für eine enzymatische Hemmung der Glykogenese spricht (10).

HN2 und Äthyl-bis-(2-chloräthyl)-amin = HN1 steigern bei Ratten und Mäusen die Adenosintriphosphatase- und 5 -Nukleotidaseaktivität in Milz und Thymus (18). Die Enzymaktivität ist dabei abhängig von der Dosis. Außerdem ist auch die Zitronensäuresynthese gestört, wobei nicht geklärt ist, inwiefern diese beiden Beobachtungen miteinander zusammenhängen. Die Serum-Nuklease-Aktivität ist dagegen nach Gabe von 2 mg/kg HN2 i.v. an Ratten nicht erhöht (14). Im Ratten-Dünndarm wird die

Transaminaseaktivität durch N-Lost herabgesetzt (8). Diese wird zu der gleichzeitigen Zerstörung der Mukosazellen in Beziehung gesetzt.

2. Störung der Eiweißsynthese

Den Beweis, daß Stickstofflost in Nukleinsäure eingebaut wird, konnte Wheeler (61) durch Verwendung von radioaktivem Kohlenstoff erbringen (HN3 = tris (Beta-chloräthyl) amin. Dabei reagiert N-Lost (60) mit den primären und sekundären Phosphoryl- und den Aminogruppen und in gewissen Fällen auch mit den Purin-, Pyrimidin- und Hydroxylgruppen der Nukleoproteine. Andere Autoren (17) kamen zu dem Ergebnis, daß N-Lost die Nukleinsäuresynthese entweder durch eine Hemmung der Phosphorylierung der Mononukleotide zu Di- und Triphosphaten oder durch eine Hemmung der Kondensation solcher Di- und Triphosphate zu Polynukleotiden unterdrückt. Auch bei Einwirkung von N-Lost auf Escherichia coli und embryonale Zellen (27) ergibt sich eine deutlich verminderte DNS-Synthese, wobei noch (5) beobachtet werden konnte, daß N-Lost in vitro DNS depolymerisiert.

An Enterythrozyten läßt sich mit HN2 eine Hämoglobinsynthesestörung nachweisen (4). Der Übertritt von Fe 59 aus dem Serum in die Erythrozyten wird verhindert. Diese Beobachtung kann aber nicht auf den Menschen übertragen werden, weil es hier durch HN2 zu einem Mitosestop der jüngeren Erythroblasten kommt. Da dadurch mehr Erythroblasten zur Reifung ansetzen, d.h. also mehr Hämoglobin gebildet wird, sinkt der Fe-Spiegel des Blutes.

Unter Einwirkung von N-Lost und N-Oxyd-Lost verschwindet die Färbbarkeit von Nukleinsäuren mit Methylpyronin, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß die Säuregruppen blockiert werden (50).

Teilum (55) beobachtete eine diffuse Amyloidablagerung in der Milz, wenn Mäusen 28 Tage lang 0,5 ml einer 5 %igen Kaseinlösung s.c. und drei Injektionen von gesamt 10 - 17,5 mg/kg N-Lost appliziert werden.

Dieser Befund wird so gedeutet (53, 55), daß die Plasmazellen und andere pyroninophile Zellen, die in einem fortgeschrittenen Zustand der aktiven Proliferation begriffen sind, durch N-Lost gehemmt werden. Diese Hemmung der zellulären Proliferation ist der Basismechanismus für die Ablagerung von Amyloid, wie er auch durch Cortison erzielt werden kann.

Auch die Antikörperbildung des RES wird durch N-Lost

charakteristisch beeinflußt, wobei der Antikörperspiegel von der Größe der Dosis abhängig ist (21).

Kleine antiphlogistische Dosen von N-Lost verstärken die Antikörperbildung, antimitotische Dosen vermindern sie, wie z. B. eine verzögerte Antitoxinbildung bei Immunisierung mit Salmonella typhi beobachtet wird, wenn dem als Versuchstier dienenden Kaninchen unmittelbar nach der N-Lost-Gabe das Antigen zugeführt wird (24). Auch die Gabe von 2,5 bis 3,5 mg N-Lost pro kg Körpergewicht an Kaninchen vermindert die Bakterizidieaktivität des Serums gegen Bazillus subtilis. Die natürlichen Agglutinine gegen Bazillus subtilis und das zirkulierende Komplement sind aber im Gegensatz zum Serumproperdinspiegel nicht vermindert (15).

Wird HN2 in aufsteigender Konzentration mit menschlichem Serum in vitro gemischt, so werden hauptsächlich die Anteile der Globulinfraktion des Serums denaturiert (46).

α_1 und α_2 Globuline können nicht mehr getrennt werden und nehmen zusammen mit den γ Globulinen zugunsten der β -Globuline ab.

3. Schädigung der Chromosomenstruktur durch N-Lost

Wie schon eingangs erwähnt, kamen andere Forscher zu dem Ergebnis, daß der toxische Einfluß des N-Lostes sich an der Chromosomenstruktur manifestiert.

Nach Gillmann und Philips (zitiert bei 49) rufen schon Schwellendosen von N-Lost Chromosomenstrukturveränderungen hervor, ohne daß dabei andere Zellbestandteile verändert werden. Diese Chromosomenschädigung wird nur noch von kurzwelligen Strahlen hervorgerufen. Goldaere und Mitarbeiter (zitiert bei 49) erklären diesen Vorgang so, daß die zwei halogenierten Seitenketten des N-Lostes oder andere doppelte Reaktionsmöglichkeiten mit den Chromatidfasern reagieren und Brückenbildungen herstellen ("Cross-linking-Verbindungen").

4. Wirkung über das neuroendokrine System

N-Lost wirkt besonders auf den parasympathischen Teil des Zentralnervensystems (21).

Das Erbrechen auf N-Lostgabe wird durch zentrale Wirkung erklärt (52), die bei der Katze (6) wahrscheinlich am Vorderhirn angreift.

In diesem Zusammenhang sei auch erwähnt, daß 1 mg/kg HN3 beim Meerschweinchen Labyrinthtaubheit hervorruft (13), wobei eine periphere Schädigung wie auch eine Destruktion der Vestibulariskerne anzunehmen ist.

Bemerkenswert ist nach einer anderen Untersuchung (11), daß die toxischen Schädigungen des Knochenmarks geringgradiger sind, wenn Ratten 15 Minuten lang vor und 45 Minuten lang nach der Injektion einer Äthernarkose unterworfen werden. Dies deutet darauf hin, daß bei der Reaktion des tierischen Organismus auf das verabreichte HN3 dem Nervensystem eine wesentliche Rolle zukommt.

N-Lost ruft eine Hypercorticotropinämie hervor (21), die zu einer entsprechenden diffusen Hyperplasie der Nebennierenrinde mit entsprechender Lympho- und Eosinopenie führt (zitiert bei 48).

Die entzündungswidrige Wirkung von N-Lost in antiphlogistischen Dosen wird einerseits teilweise hierauf zurückgeführt, andererseits eine Hemmung der Bindegewebsneubildung als Folge möglicher direkter Zellgiftigkeit erwogen (zitiert bei 48).

Dieser antiphlogistische Effekt wird bei der Behandlung sogenannter Kollagenosen ausgenutzt, wobei die Wirksamkeit noch besser ist als mit ACTH (48).

N-Lost und Nebennierenrindensteroide zeigen aber in ihrer Wirkung charakteristische Unterschiede:

So verändern N-Lost und Corticoide unterschiedlich den Ascorbinsäuregehalt der Rattenknochenmarkszellen (22) insofern, als durch Prednison bzw. Prednisolon die Ascorbinsäurebeladung der Markzellen zu-, bei N-Lost dagegen abnimmt. Da die Ascorbinsäure zur Respirationsfunktion

der Zelle in Beziehung steht, wird diese offensichtlich durch N-Lost vermindert, während sie durch Corticoide gesteigert wird.

Droste u.a. (16) beobachteten, daß bei der Ratte nach einmaliger Gabe von 100 mg/kg Endoxan die Schädigung der Granulopoese und die verminderte Phagozytoseaktivität der Leukozyten durch tägliche Gaben von 1,5 mg Prednisolon nicht aufgehoben werden kann, lediglich die Thrombopoese wird überschießend kompensiert.

Neben diesen Arbeiten, die sich mit dem Wirkungsmechanismus des N-Lostes und seiner Derivate in der Zelle selbst und auf das Neuroendokrinium beschäftigen, wurden zahlreiche Tierexperimente angestellt, um die allgemeinen biologischen Wirkungen am Tierorganismus aufzuzeigen.

Dabei werden an folgenden Organen Zeichen einer Zellschädigung gefunden:

Bei Kaninchen treten degenerative Zellveränderungen durch N-Lost im Dünndarm (23) und eine schwere Schädigung der Spermiogenese auf (zitiert bei 49). Endoxan (42) schädigt in subletalen Dosen bei Ratten die basalen Pulpenzellen in der labialen und lingualen Proodontoblastenzone, so daß es zum völligen Sistieren des Zahnlängenwachstums kommt.

Die Makrophagentätigkeit gegen Staphylococeus albus wird durch N-Lost bei der Maus nicht herabgesetzt (38), während Endoxan die Phagozytose der Leukozyten eindeutig hemmt (16).

Nachhaltig wird das Knochenmark durch N-Lost und seine Derivate beeinflußt. Dabei wird vor allem die Granulo-, Lympho- und Thrombozyto- weniger die Erythropoese geschädigt, so daß schwere Leuko- und Thrombozytopenien beobachtet werden. Das Ausmaß der Wirkung ist davon abhängig, welches Zytostatikum (N-Lost oder eines seiner Derivate) und welche Versuchsbedingungen von den Untersuchern (19, 23, 31, 34, 39, 41) gewählt wurden.

Mit der sehr wichtigen Frage, wie weit N-Lost die Mitose-

tätigkeit beeinflußt, befaßten sich Kellner u.a. (32). Sie beobachteten die Mitoseaktivität an transplantierten Rattentumoren unter N-Lost-Einwirkung (BCM) und fanden in den ersten 24 Stunden post injectionem eine Zerstörung und Verminderung der Mitosen verbunden mit einem Anschwellen der Tumoren. Der Höhepunkt der Wirkung trat nach 24 - 72 Stunden ein. Die Mitosezahl hatte sich verdoppelt bis verdreifacht. Histologisch zeigten die Tumorzellen Polyploidie, Chromosomenaberrationen und -fragmentationen. Daneben fanden sich über 50 % zwei- und mehrkernige Riesenzellen. Diese Schädigung konnte bis zu einer Woche post injectionem nachgewiesen werden.

Durch Nitromin traten bei Sarkom 37 - Ascites und Mäuseasciteshepatom 129 (P) ebenfalls Mitoseanomalien auf, die zu Polyploidie führten (47).

Bei der genaueren Analyse, in welcher Zellentwicklungsphase eine Schädigung durch N-Lost gesetzt werden kann, ergab sich bei Amphibien und Insekten (5), daß N-Lost in der Interphase nur die Proliferation teilungsaktiver Embryonalzellen, nicht aber die Differenzierung hemmt. Doch können auch Zellen ohne Mitosetätigkeit geschädigt werden und absterben.

Der karzinolytische Effekt des N-Lostes und seiner Derivate wurde an verschiedenen Tiertumoren erprobt.

Phenylalaninlost-N-Lost (54) führt zu degenerativen Zell-Veränderungen an Mäusemelanomen. Das Ehrlich-Ascitescarcinom, Mammaadenocarcinom 755 und E 0771 und das Sarkom 180 werden durch 2-(Di-(2-chloräthyl)aminomethyl) benzimidazol gehemmt (29). Durch Mitomen (N-Oxyd-Lost) nimmt die relative Neubildungsrate der in Trichloressigsäure unlöslichen -P-Fraktion des Walkercarcinom ab (20). Ebenso übt es eine starke karzinolytische Wirkung auf das Yoshidasarkom aus (39).

Therapeutisch wird N-Lost vorwiegend bei folgenden Er-

krankungen angewandt: Leukämie, Polyzythämie, Lymphogranulomatose, Lympho- und Retothelsarkom, Melanomalignom, Mykosis fungoides und bei den sog. Kollagenosen.

Gaertner (21) nennt noch folgende Indikationen:
Asthma bronchiale, Ulcus ventriculi et duodeni, Colitis, Peritonitis chronica, Endocarditis, Nephritis und Nephrose.

Im einzelnen wurden gute Erfolge nach Chlorambucilmedikation bei lymphatischer und chronischer myeloischer Leukämie und Lymphogranulomatose beobachtet (3, 26, 33), während bei den gleichen Erkrankungen Endoxan nur zu gering- bis mittelgradigen Besserungen führte (7, 25). Am besten beeinflußte Endoxan das Lymphosarkom (25). Mitomen (N-Oxyd-Lost) wird von verschiedenen Autoren (28, 2, 58) mit gutem Erfolg als zusätzliche Therapie nach Radikaloperation angewendet. Allerdings kann ein endgültiges Urteil über den Heilerfolg nicht abgegeben werden, da die 5-Jahresfrist noch nicht abgelaufen ist.

Die Elimination schließlich von N-Lost und seinen Derivaten ist verschieden und von der chemischen Konstitution der N-Lost-Derivate abhängig.

HN2 wird in der Rattenleber umgebaut, in die Galle und in das lymphatische System ausgeschieden, wodurch eine starke Einbuße der Toxicität eintritt (57). PAM (γ-di-(2-chloräthyl) amino DL (3^{14}C) alanin) wird vermutlich durch die Nieren ausgeschieden, da es in der Nierenproteinfraktion in hoher Konzentration gefunden wird (12).

Fragestellung der eigenen Untersuchungen

Das Knochenmark gehört zu den rasch proliferierenden Geweben. Die einzelne Knochenmarkszelle zeigt einen regen Stoffwechsel, und mit zytochemischer Methodik lassen sich eine Reihe von Fermenten und Stoffen nachweisen (25, 59), die in gesetzmäßiger Beziehung zum Proliferations- und Differenzierungsstoffwechsel der Knochenmarkszelle stehen, wie Pließ (43) nachweisen konnte. Er beobachtete, daß Triäthylenmelamin (TEM) unterschiedliche aber charakteristische Veränderungen im zytochemischen Verhalten der Leuko-

poese hervorruft. So ergibt sich in diesem Zusammenhang die Frage, inwieweit Endoxan in einer einzigen subletalen Dosis das zytochemische Verhalten der weißen Knochenmarkszellen beeinflußt und wieweit diese zytochemischen Veränderungen zur Proliferation und Differenzierung in Beziehung stehen.

Um morphologische und zytochemische Veränderungen des Knochenmarks zu erfassen, wurde eine histologische und zytochemische Methodik angewandt.

Ebenso wurden andere Organe histologisch untersucht, um weitere durch Endoxan bedingte Veränderungen nachzuweisen.

Material und Methodik

54 jungerwachsenen Albinoratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 140 g wurde eine frisch bereitete einmalige subletale Dosis von 150 mg/kg in aqua dest. gelöstes Endoxan intraperitoneal injiziert. Je zwei überlebende Tiere (ein Männchen und ein Weibchen) wurden nach 1, 2, 3, 6, 12, 18 Stunden, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 17, 21, 26 und 30 Tagen getötet.

Dabei wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. In einem Ätherrausch wurde aus der Schwanzvene Blut für folgende Untersuchungen entnommen:

   a) Zählung der Erythrozyten unter Verwendung der Hayemschen Lösung in der Thoma-Zeiss-Kammer

b) Zählung der Leukozyten unter Benutzung der Türkschen Verdünnungsflüssigkeit. Es wurde der Mittelwert aus zwei Füllungen der Kammer genommen.

c) Retikulozytenzählung (Brillantkresylblau-Methode)

d) Bestimmung des Differentialblutbildes und der Thrombozytenzahl aus dem Blutausstrich in der Färbung nach Pappenheim.

2. Danach wurde das Tier in Äthernarkose getötet, und es wurden sofort beide Femurknochen entnommen. Die Knochenmarkshöhle wurde in der Längsrichtung mit einem Messer eröffnet und das Mark an Ausstrichen für folgende Färbungen und zytochemische Reaktionen verwandt:

Alkalische Phosphatase und saure Phosphatase (Gomori), Peroxydase-Reaktion (Graham-Knoll), Lepehne-Färbung, Fettfärbung mit Sudan-schwarz B (nach Lison), Glykogenfärbung mit Natriumperjodat und Schiffschem Reagenz (Kontrolle durch Salivaeinwirkung), Färbung nach Pappenheim.

3. An die Verarbeitung des Knochenmarks, die in kürzester Zeit vorgenommen wurde, schloß sich eine ausgedehnte Sektion des Tieres an. Folgende Organe wurden entnommen und in 10 % Formalin fixiert: Herz, Lunge, Leber, Milz, Drüsenmagen, Duodenum und Nieren.

Beide Nebennieren wurden in Bouin'scher Lösung eingelegt. Außerdem wurden das Sternum und die Lendenwirbelsäule entnommen und nach Maximow fixiert. Nach gründlicher Fixierung wurden die Organe in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin, die Knochenmarksschnitte zusätzlich mit Giemsa gefärbt, Milz und Leber auch mit der Berlinerblau-Reaktion auf Haemosiderin untersucht.

Zum Nachweis des Glykogens wurden Leberstücke in 100 % Alkohol fixiert und die Paraffinschnitte mit Bestschem Carmin gefärbt.

Die Auszählung und Auswertung der Blut- und Knochenmarksausstriche erfolgte in folgender Weise:

1. Die prozentuale Differenzierung im peripheren Blut geschah in üblicher Weise. Im Knochenmark wurden 300 Zellelemente ausgezählt, differenziert und aus dieser Zahl der prozentuale Anteil der einzelnen Reifungsformen der Leuko- und Erythropoese errechnet.

2. Der Mitoseindex im Knochenmark wurde so bestimmt, daß 500 teilungsfähige Zellen der Leukopoese und 500 "teilungsfähige" Zellen der Erythropoese ausgezählt wurden. Die dabei gefundenen Mitosen wurden in Promille angegeben. Als "teilungsfähig" wurden in der weißen Reihe alle Reifungsstufen vom Hämozytoblasten bis zum jungen Stabkernigen und in der roten Reihe alle kernhaltigen erythropoetischen Zellen angesehen.

3. Die nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Knochenmarksausstriche wurden auf morphologische Veränderungen der einzelnen Knochenmarkszellen durchgesehen.

4. Bei der Auswertung der zytochemischen Reaktionen wurde der Stärkegrad der einzelnen Reaktionen bei den verschiedenen Reifungsstufen beachtet, und von Fall zu Fall entweder als negativ, oder hauchartig, deutlich oder stark positiv bewertet.

Ergebnisse

Allgemeinverhalten der Tiere

Vom 1. bis zum etwa 10. Tag post injectionem war das Allgemeinbefinden der Ratten stark beeinträchtigt. Die Tiere fielen durch eine Bewegungsarmut auf. Sie magerten stark ab. Das Fell wurde struppig. Der Stuhl war dünn, der Urin teilweise rötlich gefärbt. 10 Tiere starben zwischen dem 8. und 10. Tag nach der Injektion.

Sektionsbefunde

Die ersten makroskopischen Veränderungen am Knochenmark zeigen sich 12 Stunden post injectionem: Das Mark ist dunkelrot verfärbt. Bis zum 5. Tag wird es zunehmend blutreicher und flüssiger. Vom 6. Tag an wird es seiner Konsistenz nach wieder fester und erscheint glasig-ödematös. Am 8. Tag ist es bei zwei Tieren auffällig derb und läßt sich nur schwer auf dem Objektträger ausstreichen. Vom 9. Tag an nimmt das Mark eine graurote Farbe an und ist reichlich vorhanden.

Die Nebennieren sind in den ersten Stunden nach Versuchsbeginn grau-rot verfärbt, vom 2. Tag an auffällig vergrößert und zeigen dann eine weiß-gelbliche Farbe. Der gleiche Befund läßt sich mit einzelnen Ausnahmen bis zum 30. Tag post injectionem erheben.

Die Milz ist bei einigen Tieren am 5., 8., 12., 14., 17. Tag stark vergrößert. Die übrigen Organe (Herz, Leber, Drüsen-

magen, Nieren) zeigen makroskopisch keine von der Norm abweichenden Veränderungen.

Peripheres Blut

Im Verlauf der Versuchszeit wurden unter Endoxan-Einwirkung charakteristische quantitative Veränderungen der zellulären Elemente des Blutes beobachtet. Als "Norm" legen wir die von Schröder (51) ermittelten Werte zu Grunde.

Leukozyten (Tabelle 1)

Der Normwert (16.000/mm^3) wird 3 Stunden nach Versuchsbeginn überschritten (18.800). Danach fällt die Leukozytenzahl rasch ab. Nach 24 Stunden werden bereits nur noch 4.600 Leukozyten gezählt, und in dem Zeitabschnitt zwischen dem 3. und 6. Tag stellt sich eine schwere Leukopenie ein mit Leukozytenzahlen unter 1.000/mm^3. Erst ab 7. Tag post injectionem steigt die Leukozytenzahl (4.500) wieder an.

Am 9. Tag werden bereits Werte um 15.000 gefunden. Der Anstieg dauert bis zum 12. Tag (21.300 Leukozyten). In der Zeit zwischen dem 14. und 30. Tag post injectionem bewegen sich die Leukozytenwerte zwischen 17.000 und 12.000.

Differentialblutbild (Tabelle 1)

Der mittlere prozentuale Anteil der Granulozyten beträgt bei der Ratte 25 %.

Bei der Auswertung des Differentialblutbildes findet sich in den ersten 48 Stunden nach Versuchsbeginn eine Tendenz zur relativen und absoluten Granulozytose, die am 3. Tag in eine Agranulozytose umschlägt. Bis zum 5. Tag dauert die Agranulozytose an, da nur vereinzelt Segmentkernige gefunden werden (3 %).

Am 6. Tag steigt der Anteil der Reifkernigen im peripheren Blut wieder an und erreicht am 8. Tag 60 %. Vom 9. Tag bis zum 14. Tag bewegt sich die Prozentzahl der Neutrophilen um 50 %, was eine relative und absolute Granulozytose bedeutet. Ab 21. Tag sinken die neutrophilen Prozente auf den normalen "Sollwert" von etwa 25 %.

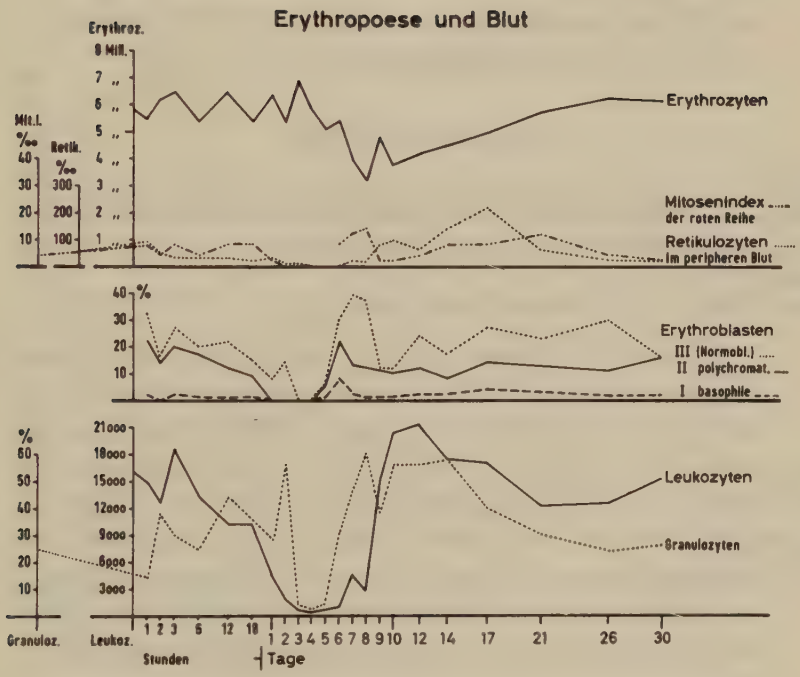
Erythrozyten (Tabelle 1)

Die normale Erythrozytenzahl wird bei der Ratte mit 5,8 Mill. pro mm^3 angegeben (51). Auch wir finden bis zum 3. Tag nach Versuchsbeginn Erythrozytenwerte zwischen 5 und 7 Mill., die sich also im Bereich der normalen Schwankungsbreite halten. Vom 5. Tag an entwickelt sich zunehmend eine Anämie. Die Erythrozytenzahl nimmt stetig ab und erreicht mit 3,2 Mill. am 8. Tag ihren niedrigsten Wert. Danach steigt die Erythrozytenzahl wieder treppenförmig langsam an und überschreitet zum ersten Mal am 17. Tag die 5 Millionengrenze. Vom 21. bis zum 30. Tag werden Werte um 6 Millionen gefunden.

Retikulozyten (Tabelle 1)

Die normale Retikulozytenzahl beträgt bei der Ratte 52 ‰ (51). Dieser Normwert wird bereits 1 Stunde post injectionem mit 90 ‰ im Sinne einer Retikulozytose weit überschritten. Ebenso rasch aber sinkt die Retikulozytenzahl bereits nach 2 Stunden auf Werte um 50 ‰ und liegt mit 30 ‰ nach 3 Stunden unter der Norm. Bis zum 1. Tag post injectionem werden dann annähernd gleichviele Retikulozyten gezählt (30 ‰). Vom 3. bis zum 6. Tag schließlich lassen sich im peripheren Blut überhaupt keine Retikulozyten mehr nachweisen. Erst am 7. Tag treten sie mit Werten von 18 ‰ wieder auf. Am 10. Tag werden 90 ‰ gezählt. Dann wird ein rapider Anstieg zwischen dem 14. und 17. Tag mit Werten bis zu 220 ‰ beobachtet. Darauf sinkt ihre Zahl rasch ab auf 60 ‰ am 21. Tag, 22 ‰ am 26. und 30. Tag.

Tabelle 1


Erythropoese und Blut
Erythroz.
9 Mill.
7 „
6 „
5 „
4 „
3 „
2 „
1
Mit.I.
‰
40
30
20
10
Retik.
‰
300
200
100
Erythrozyten
Mitosenindex der roten Reihe
Retikulozyten im peripheren Blut
40 %
30
20
10
Erythroblasten
III (Normobl.)
II polychromat.
I basophile
%
60
50
40
30
20
10
21000
18000
15000
12000
9000
6000
3000
Leukozyten
Granulozyten
Granuloz.
Leukoz.
1 2 3 6 12 18
Stunden
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 14 17 21 26 30
Tage

Thrombozyten

(Normalwert: 300.000/mm^3) (51). Während der einzelnen Versuchszeiten schwankt die Thrombozytenzahl stark, jedoch ist eine stark abfallende Tendenz zu beobachten. Nach 2 Stunden werden noch 280.000, am 5. Tag aber nur 40.000 Thrombozyten gezählt. Vom 6. Tag an steigen die Thrombozytenwerte wieder an, wobei bereits am 8. Tag ein Wert von 270.000 Thrombozyten gefunden wird. Vorübergehend sinkt ihre Zahl zwischen dem 10. und 17. Tag noch einmal auf durchschnittlich 160.000, um sich dann vom 26. Tag an dem Normwert zu nähern.

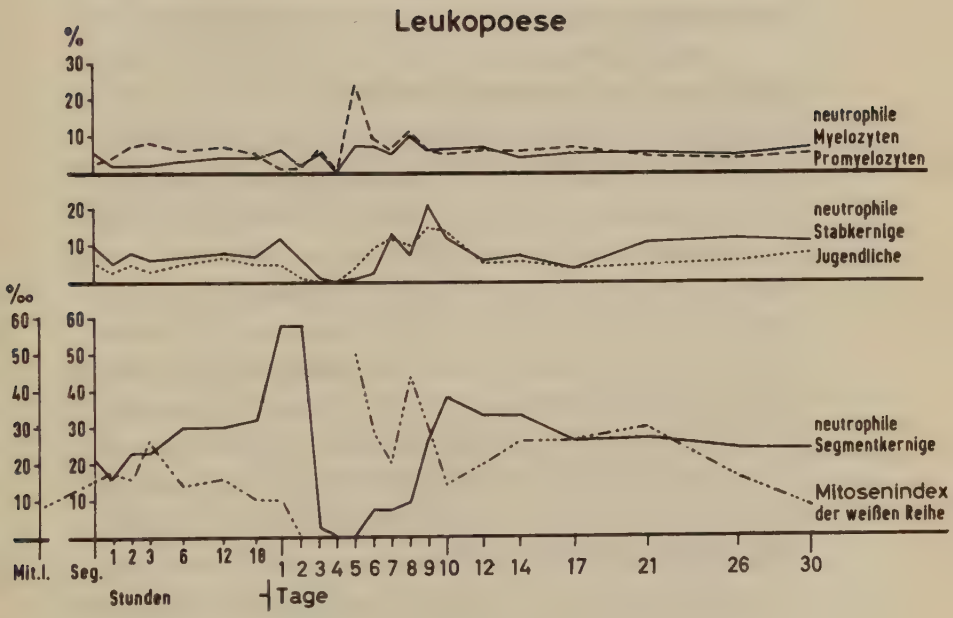
Knochenmarkauszählung

Bei der zahlenmäßigen Auswertung des Knochenmarks (Tabelle 1 und 2) lassen sich drei Phasen unterscheiden:

Phase I (1 - 24 Stunden post injectionem):

In den ersten zwei Stunden nehmen die polychromatischen Erythroblasten und die Normoblasten prozentual bereits stark ab. Die polychromatischen Erythroblasten sind nach einem Tag im Knochenmark nicht mehr nachweisbar. Die Normoblasten dagegen scheinen weiter zu reifen und ausgeschwemmt zu werden. In der weißen Reihe finden sich in den ersten 18 Stunden folgende prozentuale Verschiebungen der Knochenmarkselemente: ein starker Anstieg der Promyelozyten, eine geringe relative Verminderung der Myelozyten und ein starker Anstieg der Segmentkernigen. Nach 24 Stunden nimmt der prozentuale Anteil der Reifkernigen bis auf annähernd 60 % stark zu. Auch die neutrophilen Stabkernigen werden etwas häufiger gefunden, während die Promyelozyten und Myelozyten wieder stark abnehmen, so daß die prozentuale Zusammensetzung des Knochenmarks jetzt im Sinne einer extremen Rechtsverschiebung verändert ist.

Tabelle 2


Leukopoese
%
30
20
10
neutrophile
Myelozyten
Promyelozyten
20
10
neutrophile
Stabkernige
Jugendliche
‰
60
50
40
30
20
10
neutrophile
Segmentkernige
Mitosenindex
der weißen Reihe
Mit.l.
Seg.
1 2 3 6 12 18
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 12 14 17 21 26 30
Stunden
Tage

Phase II (2. - 4. Tag post injectionem):

Sie beginnt mit der Einstellung der Erythropoese nach 24 Stunden. In dieser Zeit sind auch die letzten, vermutlich noch ausreifenden Normoblasten (am 3. Tag) verschwunden.

In der weißen Reihe finden sich vom 2. bis 3. Tag nur noch ganz vereinzelte Promyelozyten und Jugendliche (prozentual = 0) mit Ausnahme einer Ratte, deren Mark noch reichlich Promyelozyten enthält. Ebenso sinken die neutrophilen Stab- und Segmentkernigen praktisch auf 0 %. Es finden sich fast ausschließlich indifferente Zellen (vergl. unten).

Phase III (5. - 30. Tag post injectionem):

Sie beginnt am 5. Tag mit fast gleichzeitiger Regeneration von Erythro- und Leukopoese. In der roten Reihe treten basophile Erythroblasten auf, die sofort bis zum Normoblasten reifen. Alle drei Vorstadien der Erythrozyten nehmen bis zum 6. bzw. 7. Tag stark zu, was im wesentlichen durch ein Nachhinken der Leukopoese bedingt ist. Vom 9. Tag an normalisieren sich die prozentualen Werte der basophilen und polychromatischen Erythroblasten zueinander und zur Leukopoese. Vom 9. bis zum 12. Tag tritt die Erythropoese gegenüber der Leukopoese in den Hintergrund, um dann vom 17. Tag an sich dem Ausgangswert zu nähern (basophile Erythroblasten 2 bis 4 %, polychromatische Erythroblasten um 10 %, Normoblasten 25 bis 30 %).

Die Leukozytenregeneration beginnt frühestens am 5. Tag auf der Stufe der Promyelozyten mit Werten bis zu durchschnittlich 24 %. Diese starke Linksverschiebung nimmt bis zum 8. Tage wieder ab. Die neutrophilen Stab- und Segmentkernigen treten am 6. Tag wieder auf. Am 9. und 10. Tag steigt der prozentuale Anteil der Reifkernigen bis zu 26 % und 38 % an. Danach nimmt ihre Prozentzahl langsam auf normale Werte von 25 % am 30. Tag ab. Der prozentuale Anteil der Stabkernigen beträgt am 7. Tag 13 %

und ist größer als der der Segmentkernigen (7 %). Am 8. Tag aber bereits verschiebt sich das prozentuale Verhältnis zugunsten der Segmentkernigen dadurch, daß die Zahl der Stabkernigen vorübergehend abnimmt (7 %). Am 9. Tag schließlich wird mit 21 % der größte Prozentwert der Stabkernigen in der Regenerationsphase beobachtet. Danach fällt er am 12. Tag auf 7 % ab, steigt jedoch ab 21. Tag wieder auf den Normalwert von 10 %. Die Prozentzahl der Jugendlichen nimmt vom 5. Tag kontinuierlich zu und erreicht am 9. Tag einen Maximalwert von 15 %. Dennoch sinkt der prozentuale Anteil wieder auf Werte von 5 %, um gegen Ende der Versuchszeit wieder etwas anzusteigen (30. Tag 8 %). Die prozentuale Myelozytenzahl beträgt am 5. Tag 7 % und erreicht am 8. Tag einen Gipfel von 10 %. Die Prozentzahl vermindert sich dann langsam auf den Normalwert in der Größenordnung von 5 %.

Mitoseindex

1. Mitoseindex der Leukopoese

Der Mitoseindex bewegt sich in der ersten und zweiten Stunde um 17 ‰. Er liegt damit eindeutig über der Norm, die für Ratten mit 8 ‰ angegeben wird (51). Bei den Myelozyten kommen während dieser Zeit einige Pyknomitosen zur Beobachtung. Nach 3 Stunden werden 26 Mitosen pro tausend weißer teilungsfähiger Zellen gezählt. Nach 6 und 12 Stunden sinkt der Mitoseindex auf 15 bzw. 16 ‰, nach 18 und 24 Stunden auf 11 bzw. 10 ‰. Zahlreiche Zellen zeigen Pyknomitosen. Am 2. bis zum 4. Tag werden keine Kernteilungen mehr beobachtet. Am 5. Tag setzt bei einer Ratte eine sehr lebhafte Knochenmarksregeneration ein, wobei ein Mitoseindex von 52 ‰ gefunden wird. Vom 6. Tag an setzt bei allen Versuchstieren eine lebhafte Zellregeneration ein. Der Mitoseindex beträgt am 6. Tag 29 ‰, sinkt dann am 7. Tag vorübergehend auf 21 ‰ ab, um dann am 8. Tag

wieder auf 45 %o anzusteigen. Damit ist der höchste durchschnittliche Mitoseindex erreicht. Vom 9. bis zum 12. Tag nimmt die Mitosezahl annähernd gradlinig ab (30, 25, 21 %o). Es treten wieder Pyknomitosen auf. Vom 14. Tag an steigt der Mitoseindex auf 26 %o an. Am 21. Tag werden noch einmal 31 Mitosen gezählt. Am 30. Tag kehrt der Mitoseindex auf den Normalwert von 9 %o zurück.

2. Mitoseindex der Erythropoese (3 %o normal)

In den ersten 18 Stunden schwankt die Mitosezahl der teilungsfähigen roten Zellen zwischen 9 und 5 %o. Am 1. Tag post injectionem sinkt sie auf 2 %o ab. Zahlreiche Pyknomitosen treten in Erscheinung. Vom 2. bis zum 5. Tag werden keine Mitosen mehr gezählt. Am 6. Tag steigt dann die Mitosezahl, verbunden mit dem vermehrten Auftreten von basophilen und orthochromatischen Erythroblasten und Normoblasten auf 9 %o. Dieser Anstieg dauert bis zum 8. Tag mit einer Mitosezahl von 14 %o. Dann verringert sich die Zahl der sich teilenden Zellen am 9., 10. und 12. Tag auf 3 bis 4 %o. Vom 14. und 17. Tag an werden mehr Mitosen beobachtet (9 %o), wobei diese Mitosetätigkeit der roten Zellen am 21. Tag noch auf 11 %o steigt. Am 26. und 30. Tag beträgt der Mitoseindex nur noch 3 bzw. 2 %o (Normalwerte).

Histologische Befunde des Knochenmarks

2 Stunden post injectionem wird das Knochenmark des Sternum zunehmend hyperämisch, und es bildet sich ein Ödem aus. Die Zellelemente der Leukopoese sind groß, mit zahlreichen Mitosefiguren. Die Knochenspongiosa ist bei einzelnen Ratten von Osteoblastensäumen umlagert, deren Zytoplasma deutlich basophil ist. Nach 18 Stunden werden nur noch wenige erythropoetische Zellen gefunden. Die unreifen Vorstufen der neutrophilen Granulozyten liegen auffällig in einzelnen Gruppen zusammen,

so daß man von einer stellenweisen Linksverschiebung im Knochenmark sprechen könnte. Daneben finden sich aber massenhaft Segmentkernige, die durch Zellübergröße imponieren und deren Kerne teilweise karyorhektisch sind. Auch die Kerne der eosinophilen Leukozyten verklumpen nach einem Tag. 2 Tage post injectionem verschwinden die letzten Megakaryozyten. Sie verlieren zum Teil ihre Kerne. Neben einigen restlichen Riesen-Jugendlichen und -Granulozyten treten große indifferente Zellen mit einem hyperchromatischen Kern auf. Die Osteoblastensäume sind gewuchert. Daneben besteht eine deutliche Hyperämie und Ödembildung. Nach 3 Tagen finden sich einzelne große eosinophile Zellen, die dem Endost und den Knochenbälkchen angelagert sind. Neben verstreuten Retikulumzellen liegen auch indifferente, basophile Zellen um die Sinus.

Am 4. Tag nach Versuchsbeginn - teilweise bereits schon am 3. Tag - beginnen Retikulumzellen zu schwellen und zu proliferieren. Das Endost wuchert mit Faserbildung. Die ersten Ansätze einer Leukopoese treten am Endost auf. Am 5. Tag setzt auch Leukozytenbildung in unmittelbarer Nachbarschaft der Sinus ein. An diesen beiden Prädilektionsorten sind basophile "Stammzellen" mit hyperchromatischen Kernen deutlich vermehrt und zeigen Mitosetätigkeit. Die ersten Reifungsformen der Leukopoese sind auffällig groß. 6 Tage post injectionem tritt auch die Erythropoese vermehrt in Erscheinung. Dabei finden sich die erythropoetischen Zellen in den Räumen zwischen den Sinus. Auch Megakaryozyten erscheinen wieder. In der folgenden Versuchszeit nimmt dann die Zelldichte im Knochenmark des Sternum progressiv zu, während gleichzeitig die Hyperämie zurückgeht. Eine Ödembildung ist noch bis zum 10. Tag post injectionem nachweisbar. Erythro- und Leukopoese normalisieren sich danach zunehmend. Die gleichen histologischen Befunde konnten auch bei der Durchmusterung des Knochenmarks der Wirbelkörper erhoben werden.

Morphologisches und zytochemisches Verhalten der neutrophilen Leukopoese

Bei der zytomorphologischen Beurteilung des Knochenmarks lassen sich in grober Einteilung vier Phasen unterscheiden:

1. Irritative Phase (1 Stunde bis 24 Stunden post injectionem)

Die irritative Phase ist durch eine akute toxisch-degenerative Schädigung der Leukopoese gekennzeichnet.

Bei der Anfärbung des Knochenmarks nach May-Grünwald-Giemsa zeigen sich die ersten Anzeichen einer Zellschädigung nach einer Stunde in Form einer Hyperbasophilie des Plasma bei den Promyelozyten wie auch teilweise bei den Myelozyten. Nach 2 Stunden findet man eine vermehrte Granulierung und Vakuolisierung der Promyelozyten und eine toxische Granulation wie auch Vakuolisierung der Myelozyten. Von den Jugendlichen an bis zu den neutrophilen Granulozyten zeigt sich eine vermehrte Tendenz zur Kernhypersegmentierung. Nach 3 Stunden verstärkt sich die Zytoplasmabasophilie und toxische Granulation der Promyelozyten und Myelozyten. Außerdem sind die Granulozyten übergroß und hypersegmentiert. Weitere auffällige Veränderungen treten nach 6 und 12 Stunden nicht auf. Nur die toxische Granulation nimmt zu, die bei einer Ratte, die nach 12 Stunden getötet wurde, bis zu den Stabkernigen vorhanden ist. Nach 18 Stunden verstärkt sich die toxische Granulation wie auch die Basophilie des Zytoplasma der Promyelozyten und Myelozyten. Die Jugendlichen sind deutlich ihrem Kern und ihrem Gesamtvolumen nach vergrößert. Die Kernhypersegmentierung nimmt nach den Granulozyten hin zu.

In zytochemischer Hinsicht ergeben sich in der ersten Phase folgende Veränderungen:
Alkalische Phosphatase läßt sich 2 Stunden post injectionem zuerst in den hypersegmentierten Stab- und Reifkernigen nach-

weisen. In den folgenden Stunden bis zum Ende der ersten Periode steigt die Ausrüstung an alkalischer Phosphatase in den morphologisch geschädigt erscheinenden - also in den hypersegmentierten und hyperbasophilen Myelozyten bis zu den Reifkernigen - progredient an.

Auch der Gehalt an Peroxydase nimmt in dem gleichen Zeitabschnitt zu, wobei besonders die Myelozyten übernormale Werte zeigen.

An Glykogen sind zunächst nur die hypersegmentierten Stab- und Reifkernigen reich. Aber bereits nach 12 Stunden ist der Glykogengehalt bei allen hypersegmentierten Myelozyten, Jugendlichen und Stabkernigen überdurchschnittlich groß, ebenso bei allen übrigen Zellen, wobei aber das meiste Glykogen in den reifen Segmentkernigen angehäuft ist. Bei der Auswertung der Sudan-schwarz-Färbung lassen sich nach der ersten und zweiten Stunde nach Versuchsbeginn in allen Zellen vom Promyelozyten an bis zu den Segmentkernigen reichliche, bei den Stab- und Reifkernigen, zum Teil auch schon bei den Myelozyten, diffus konfluierende Lipoidsubstanzen nachweisen. Auch der Lipoidgehalt nimmt in den folgenden Stunden zu und erreicht in den Riesengranulozyten exzessive Werte.

2. Aplastische Phase (2 - 4 Tage post injectionem)

Die zweite Phase, die, wie oben bereits beschrieben, mit einer Einstellung der Erythropoese beginnt, ist durch eine weitgehende Markentleerung gekennzeichnet.

Nach einem Tag zeigt ein Präparat bereits eine hohe Zellarmut. Man gewinnt den Eindruck des Proliferations-Stop der weißen Reihe auf der Stufe der Promyelozyten und Myelozyten. Dabei weisen diese Markzellen pathologische Ausreifungsformen auf in Gestalt von Kernhypersegmentierung und Zellübergröße. Zum Teil scheint diese Riesenzellgeneration nicht lebensfähig zu sein, teilweise aber reifen sie weiter zu hypersegmentierten

und übergroßen Stab- und Reifkernigen. Die rote Reihe ist fast völlig gehemmt. Nach 2 Tagen sind die Promyelozyten und Myelozyten fast völlig aus dem Knochenmark verschwunden. Man sieht nur noch ausreifende Granulozyten, die durch Hypersegmentierung und Übergröße charakterisiert sind. Nach 3 Tagen findet sich in einem Präparat eine beginnende Regeneration mit hyperbasophilen Hämozytoblasten, Promyelozyten und Myelozyten. Die beiden letzteren Reifungsstufen sind toxisch granuliert. Die Myelozyten bis zu den Jugendlichen zeigen eine Übergröße und Hypersegmentierung. Daneben treten hyperbasophile Riesenmyelozyten mit Zeichen des Zellunterganges auf. Bei der anderen Ratte, die 3 Tage post injectionem getötet wurde, wie auch bei den Tieren, die nach 4 Tagen untersucht wurden, findet man ein fast leeres Mark, in welchem indifferente Zellen auftreten. Sie sind den Retikulumzellen zuzuordnen, da sie außer einer unterschiedlichen Größe ein schwach basophiles Zytoplasma, einen entweder runden oder gekerbten oder gelappten Kern mit relativ heller und lockerer Chromatinstruktur aufweisen.

Zytochemisch fallen weiterhin die hypersegmentierten und hyperbasophilen Myelozyten, Jugendlichen, Stab- und Reifkernigen durch die erhöhte Aktivität der alkalischen Phosphatase auf. Es treten aber auch hypersegmentierte Stab- und Segmentkernige auf, die "normale" Phosphatasewerte zeigen. Am 2. Tag nach Versuchsbeginn läßt sich nur noch bei einer Ratte alkalische Phosphatase in den leukopoetischen Zellen nachweisen. Parallel dazu verhält sich die Peroxydasereaktion: Bis zu einem Tag post injectionem nimmt der Gehalt an Peroxydase in allen Zellen der weißen Reihe zu. Am 2. Tag weisen nur noch die übergroßen Myelozyten positive Zellareale auf. Daneben geben noch vereinzelte Stab- und Reifkernige eine positive Peroxydasereaktion. In den folgenden 2 Tagen sind alkalische Phosphatase- und Peroxydase-Reaktionen auf Grund der hochgradigen Zellarmut nicht mehr sicher zu beurteilen.

Hochgradig Glykogen-haltig sind 1 Tag post injectionem weiterhin die hypersegmentierten Stab- und Reifkernigen, zu denen am 2. Tag auch die hypersegmentierten Myelozyten und Jugendlichen kommen. Hinsichtlich des Lipoidgehaltes wird nach 24 Stunden eine weitere, weit über der Norm liegende, Fettanreicherung in den Jugendlichen bis zu den Segmentkernigen beobachtet. Dabei treten Fettschollen im Zytoplasma auf. Exzessiv hohen Lipoidgehalt zeigen am 2. Tag die restlichen Stab- und Reifkernigen.

3. Regenerationsphase (5. - 18. Tag post injectionem)

Nach 5 Tagen setzt eine allgemeine Regeneration ein, die bei einer Ratte spärlich, bei der zweiten massiv ist. Die Regeneration beginnt vom Promyelozyten an. Das Plasma der Promyelozyten bis zu den Jugendlichen ist hyperbasophil und toxisch granuliert. Vom Myelozyten an besteht außerdem die Neigung zur Kernhypersegmentierung. Nach 6 Tagen stehen zwei Zellgenerationen nebeneinander: (a) Erste regenerierende Reihe: Sie ist durch toxische Granulation, Hyperbasophilie des Zytoplasma und deutliche Tendenz zur Zellübergröße gekennzeichnet. (b) Neue hyperplastische Generation: Sie ist charakterisiert durch Plasmahyperbasophilie, Normalisierung der Zellgröße, geringe Tendenz zur Kernhypersegmentierung und fehlende toxische Granulation. Am 7. Tage zeigt sich ein ähnliches Bild wie am 6. Tag. Auffällig ist die stark ausgeprägte Erythropoese. Nach 8 Tagen ist das Knochenmark stark hyperplastisch. Teilweise ist das Zellplasma der Myelozyten und Jugendlichen noch deutlich hyperbasophil und toxisch granuliert. Die Kerne der Stabkernigen neigen zur Hypersegmentierung. Die erste Generation weist Zellübergröße auf. Neigung zur Übergröße und zur Hypersegmentierung zeigt auch die zweite, nicht toxisch granulierte Generation. Am 9. Tage findet sich das gleiche Bild wie am Tag zuvor. Nach 10 Tagen ist die Regeneration im Knochen-

mark beider Ratten nur spärlich. Faserige Strukturen erscheinen und ergeben das Bild vom Fasermark. Die Stabkernigen und neutrophilen Granulozyten sind wie auch am 12. Tag übergroß und hypersegmentiert. Am 14. Tag post injectionem sind in einem Präparat die Promyelozyten bis zu den Jugendlichen teilweise vakuolisiert und toxisch granuliert und zeigen ein basophil getüpfeltes Zytoplasma. Nach 17 Tagen treten in dem Knochenmark einer Ratte wiederum toxische Granulationen und eine basophile Tüpfelung der Promyelozyten bis zu den Jugendlichen auf. Die Stab- und Reifkernigen verhalten sich wie nach 12 Tagen.

In der Regenerationsphase finden sich folgende zytochemische Veränderungen: Am 6. Tag nach Versuchsbeginn geben die hyperbasophilen Myelozyten eine über der Norm liegende alkalische Phosphatase-Reaktion, während einige andere Myelozyten nur eine geringe Ausrüstung an Phosphatase zeigen. Auch die übergroßen Jugendlichen, Stab- und Reifkernigen sind reichlich mit alkalischer Phosphatase beladen. Bis zum 17. Tage verändert sich dieses zytochemische Verhalten nur unwesentlich. Am 17. Tag dann gewinnt man histochemisch den Eindruck der Spaltung in zwei Zellgenerationen. Die eine Zellgeneration ist durch eine geringe, ja teilweise nicht nachweisbare Fermentbeladung an alkalischer Phosphatase gekennzeichnet und ist zytomorphologisch der hyperplastischen Generation (b) zuzuordnen, während die andere Zellgeneration reichlich mit alkalischer Phosphatase ausgerüstet ist und morphologisch der ersten regenerierenden Reihe (a) entspricht. Die Aufspaltung in zwei sich zytochemisch verschieden verhaltende Generationen ist bei der Beurteilung des Lipoidgehaltes und der Ausrüstung an Peroxydase bereits am 9. Tag nach Versuchsbeginn möglich. Im einzelnen ist die Peroxydasereaktion am 5. Tag nur leicht positiv bei hyperbasophilen Myelozyten, wobei die positive Färbung in einem Aufhellungsbezirk am Kern auftritt. Am 6. und 7. Tag zeigt sich eine fleckförmige, verstärkt positive

Reaktion bei den Myelozyten, hypersegmentierten Stab- und Reifkernigen. Am 9. Tag dann tritt die aber bereits angeführte Aufspaltung ein, die sich in der Folgezeit immer mehr dadurch verdeutlicht, daß Myelozyten, Jugendliche und Stabkernige auftreten, die histochemisch keine nachweisbare Peroxydaseausrüstung erkennen lassen.

Was die Lipoidausrüstung nach Beginn der Regeneration betrifft, so nimmt am 7. und 8. Tag der Lipoidgehalt vom Myelozyten bis zum Segmentkérnigen, über der Norm liegend, zu. Am 9. Tag tritt eine Spaltung in eine stark lipoidreiche und in eine lipoidarme Reifungsreihe ein, die beim Myelozyten einsetzt. Daraus ergibt sich ein unterschiedlicher Lipoidgehalt bei den Reifungsformen gleicher Stufe. In den nächsten Tagen werden ähnliche Befunde erhoben. In dem gleichen Zeitabschnitt sind die hypersegmentierten Jugendlichen, Stab- und Reifkernigen stark mit Glykogen angereichert, während die morphologisch nicht veränderten Stab- und Segmentkernigen glykogenarmer erscheinen.

4. Normalisierungsphase (ab 21. Tag post injectionem)

Die Normalisierungsphase beginnt mit dem 21. Tag nach Versuchsbeginn. Von diesem Tag an treten Stab- und Segmentkernige auf, die sich in ihrer Größe zunehmend der Norm nähern und deren Kerne sich in ihrer Struktur verdichten. Daneben finden sich aber noch einige Myelozyten mit hyperbasophilem Zytoplasma und toxischer Granulation.

Nach 26 Tagen sind die Stabkernigen noch immer groß und hypersegmentiert. Diese Veränderungen nehmen bei den Reifkernigen ab. Einige Myelozyten und Jugendliche (in einem Präparat auch die Stabkernigen) sind toxisch granuliert. Nach 30 Tagen ist die Übergröße und Hypersegmentierung der Stab- und Reifkernigen nur noch angedeutet. Daneben treten vereinzelt toxisch granulierte und hyperbasophile Myelozyten und Jugendliche auf.

Die Normalisierungsphase ist also mit dem 30. Tag nach Versuchsbeginn noch nicht vollkommen beendet. Zytochemisch sind die einzelnen leukopoetischen Zellen unterschiedlich an alkalischer Phosphatase, Peroxydase, Glykogen und Lipoiden ausgerüstet je nach dem, welcher Reifungsgeneration sie angehören.

Zytochemisches Verhalten der eosinophilen Reihe der Leukopoese

Die zytochemischen Veränderungen auf Endoxan-Gabe sind hier nicht so charakteristisch. Immerhin ist bemerkenswert, daß die eosinophilen Knochenmarkszellen bis zum 2. Tag post injectionem zunehmend reicher an Peroxydase werden. Die Reaktion wird etwa am 14. Tag negativ.

Etwa vom 2. Tag an ist das Zytoplasma der eosinophilen Zellen reichlich, teilweise exzessiv mit Lipoiden angereichert. Dieser Lipoidreichtum läßt sich bis zum 10. Tag nachweisen.

Eine vermehrte Ausrüstung an saurer Phosphatase ist bereits nach 3 Stunden deutlich, wobei die Stärke der Reaktion zu den eosinophilen segmentkernigen Zellen hin zunimmt. Der Gehalt an saurer Phosphatase ist bei den einzelnen eosinophilen Zellen sehr unterschiedlich und schwankt stark innerhalb der Versuchszeit. Vom 12. Tage bis zum Versuchsende besteht eine deutliche Aktivitätszunahme.

Zytochemisches Verhalten der Erythroblasten

Mit den von uns verwandten histochemischen Methoden konnte in den Erythroblasten nur saure Phosphatase nachgewiesen werden. Wir fanden eine deutlich positive Reaktion bei Endoxan-Medikation erst am 5. Tag. Dabei enthalten die polychromatischen Erythroblasten und die Normoblasten reichlich, körnig oder

diffus, das Reaktionsprodukt. Die Phosphataseanreicherung nimmt am 7. Tag stark zu und ist dann in der Folgezeit unterschiedlich deutlich. Außerdem wird an den hyperregenerierenden Erythroblasten eine Hyperbasophilie beobachtet.

Organbefunde

Milz: Die ersten Anzeichen einer Reaktion der Milz auf Endoxangabe treten nach 3 Stunden auf: Die Reaktionszentren enthalten vermehrt Mitosen und Zellen, deren Kerne in gröbere basophile Chromatintrümmer auseinanderfallen. 6 Stunden nach Versuchsbeginn kommen in den Maschen der roten Pulpa Häufchen von kleinen Leukozyten zur Beobachtung, die geschrumpft erscheinen und deren Kerne zerfallen. Von der 18. Stunde an verkleinern sich die Follikel und Reaktionszentren, und die letzteren werden immer seltener gefunden. Die aus retothelialen Zellelementen bestehenden Scheiden der Lymphfollikel werden schmäler und ihre Abgrenzung gegenüber der roten Pulpa unscharf.

Die Erythro- und Leukopoese, die auch unter normalen Bedingungen in der Rattenmilz gefunden werden, werden mehr und mehr eingestellt. Die Zellkerne der Ausreifungsformen der Leukopoese zeigen deutlich Karyorhexis.

Am 1. Tag schließlich ist keine Blutbildung mehr nachweisbar. Die Follikel sind klein und enthalten keine Reaktionszentren. Die rote Pulpa ist deutlich hyperämisch. Die letzten Megakaryozyten sind verschwunden. Die Retikulumzellen haben unterschiedlich viel Hämosiderin gespeichert. Gleiche Befunde werden bis zum 4. Tag post injectionem erhoben. Am 5. Tag beginnen sich die Retikulumzellen lebhaft zu teilen. Die Zellen selbst sind geschwollen. In der roten Pulpa wie auch in den noch schmalen Follikel-Scheiden finden sich Ansätze einer Leukopoese. Die Erythropoese setzt erst am 6. Tag ein. Am 7. Tag treten auch wieder Megakaryozyten auf. Die Follikel werden größer, und ihre Scheiden, die deutliche Leukopoese zeigen, verbreitern sich.

Der Zellgehalt der roten Pulpa ist stark erhöht. Es finden sich massenhaft Retikulumzellen, leuko- und erythropoetische Zellen. Die ersten Reaktionszentren treten am 12. Tag post injectionem wieder in den Follikeln auf, die in der folgenden Versuchszeit auch wieder mitoseaktive Zellen und Zellen mit Karyorhexis enthalten.

Bei der Auswertung der Eisenfärbung zeigt sich, daß die Eisenspeicherung der Retikulumzellen der roten Pulpa und der Follikel progressiv bis zum 6. Tag nach Versuchsbeginn zunimmt. Sie sinkt dann vom 7. Tag nach Versuchsbeginn langsam wieder ab.

Leber: Bei der Auswertung der Leberhistologie ist zu bedenken, daß schon physiologischerweise intraazinäre und periportale Blutbildungsherde bei der Ratte auftreten.

Nach 1 Stunde post injectionem finden sich zahlreiche Mitosen der Leberzellen bei einem Versuchstier, wobei teilweise atypische Mitosefiguren auftreten. Die Mitosenzahl der Leberzellen des entsprechenden zweiten Versuchstieres ist dagegen gering. Die übrigen sich nicht teilenden Zellen zeigen Kern- und Nukleolenschwellung. Auch die Kupfferschen Sternzellen erscheinen vergrößert. Nach 2 Stunden tritt eine vermehrte histiozytäre Infiltration des periportalen Gewebes auf, die bei einer Ratte nach 3 Stunden post injectionem mit deutlicher eosinophiler Leukopoese verbunden ist. Das Zytoplasma der Leberzellen ist granulär getrübt. Nach 6 Stunden sind intraazinäre, z.T. granulomartig aufgebaute histiozytäre Infiltrate reichlich vorhanden. Die Histiozyten "reifen" zu großen Leukozyten. Innerhalb dieser Zellanhäufungen sind die Leberzellen häufig geschwunden.

Nach 18 Stunden verdichtet sich das Chromatin der Leberzellkerne. Die Kerne enthalten zum Teil mehrere geschwollene Nukleolen. Die mächtig entwickelten intraazinären Infiltrate enthalten kleine und große Zellen mit deutlich basophilem Zytoplasma. Auch die nur noch wenigen Zellen in den periportalen Feldern zeigen ein

stark basophiles Zytoplasma.

Am 1. Tag nach Versuchsbeginn sind die Infiltrate in den Sinusoiden und die histiozytäre Infiltration in dem Bindegewebszwickel verschwunden. Jegliche Erythro- und Leukopoese ist erloschen. Die Leberzellkerne sind jetzt groß und hell. Die gleichen Befunde wiederholen sich bis zum 6. Tag, außer daß bei einem Versuchstier am 4. Tag post injectionem gehäuft doppelkernige Leberzellen auftreten. Am 7. Tag dann kommt es zu einer herdförmigen Schwellung der Kupfferschen Sternzellen. In den Sinusoiden sind multiple basophile Zellelemente gelagert. Auch in den periportalen Feldern treten Zellen mit stark basophilem Zytoplasma auf. Vom 8. Tag läßt sich in den zunehmend sich vergrößernden intraazinären und periportalen Histiozyten-Infiltraten unter Bildung von Riesenleukozyten Leukopoese nachweisen.

Nach 10 Tagen "reifen" bei einer Ratte in den intraazinären Infiltraten auch erythropoetische Zellen. Die Leberzellen innerhalb der Infiltrate zeigen Zytolyse.

Bei dem gleichen Versuchstier tritt auch ein großes nekrotisiertes leukozytenhaltiges Granulom auf. In der folgenden Versuchszeit steht die Blutbildung in der Leber ganz im Vordergrund aller Veränderungen. Am 17. Tag post injectionem treten als Ausreifungsformen der Leukopoese in den periportalen Feldern große und kleine Leukozyten auf. Gegen Ende der Versuchszeit nimmt dann die Intensität der extramedullären Blutbildung in der Leber ab.

Der Glykogenbestand der Leber verhält sich während der Versuchszeit recht uncharakteristisch. Allerdings nimmt bis zum 1. Tag post injectionem der Glykogengehalt der Leber unterschiedlich ab. Teils haben die Leberzellen überhaupt kein histochemisch nachweisbares Glykogen mehr gespeichert, teils zeigen nur noch Gruppen von Leberzellen eine positive Färbung. Die

Leukozyten in den intraazinären Infiltraten sind dagegen reichlicher mit Glykogen ausgerüstet.

Vom 2. Tag post injectionem an enthalten dann die Leberzellen der ganzen Läppchen zunehmend mehr Glykogen.

Anders verhält sich dagegen die Eisenspeicherung der Leber. Bis zum 5. Tag nach Versuchsbeginn ist die Eisenreaktion in den Leberzellen und Kupfferschen Sternzellen negativ. Vom 6. Tag nach Versuchsanfang beginnen einzelne Kupffersche Sternzellen und Fibrozyten in den periportalen Feldern sich mit Eisen zu beladen. Die Eiseneinlagerung nimmt bis Ende der Versuchszeit noch zu, wobei multiple Kupffersche Sternzellen und auch Fibrozyten in den Bindegewebszwickeln eine positive Eisenreaktion ergeben.

Herz: Die histologische Durchmusterung des Herzens ergab keine wesentlichen Befunde, die auf eine etwaige Endoxanwirkung zurückzuführen wären.

Niere: Die schon unter normalen Bedingungen vorhandenen geringen histiozytären Infiltrate der Niere verschwinden etwa vom 1. Versuchstag und erscheinen vereinzelt erst wieder vom 14. Tag nach Versuchsbeginn.

Magen und Duodenum: Die Mukosa des Magens ist bei einzelnen Ratten von der 18. Stunde post injectionem an atrophisch verändert. Sie ist auffällig glatt und schmal. Die schon normalerweise vorhandenen basalen Infiltrate von eosinophilen Leukozyten und Histiozyten treten bis etwa zum 3. Versuchstag nur noch vereinzelt auf. Sie sind erst wieder etwa vom 10. Tag post injectionem nachweisbar, nehmen in der folgenden Versuchszeit zu und greifen dabei zum Teil auf die Submukosa über.

Im Duodenum ist die Mitoseaktivität der indifferenten Epithelzellen im Bereich der Krypten im Verlauf des Versuches nicht sehr auffällig beeinträchtigt. Hin und wieder treten bei einzelnen

Ratten in den basalen Schleimhautabschnitten vermehrt Zellen mit deutlicher Kernpyknose auf. Die leuko- und histiozytären Infiltrate werden spärlicher und sind etwa nach 3 Tagen nicht mehr nachweisbar, treten aber am 9. Tag post injectionem wieder auf und enthalten eosinophile Leukozyten und Histiozyten, zum Teil auch Lymphozyten.

Nebennieren: Schon 1 Stunde post injectionem erscheinen die Zellen der Zona fasciculata und reticularis lipoidarm, während der Lipoidgehalt der Zellen in der Zona glomerulosa unterschiedlich ist. Von der 12. Stunde nach Versuchsbeginn an ist das Zytoplasma der Zellelemente im Mark der Nebenniere aufgehellt, das sich aber bereits 1 Tag post injectionem wieder verdichtet und zunehmend basophil wird. Einzelne Kerne der Markzellen zerfallen in gröbere Chromatinbröckel. Das Nebennierenmark ist deutlich hyperämisch. Die Zellkerne der äußeren Fasciculataschicht liegen nach 18 Stunden dicht beieinander. Einzelne Mitosen treten in der äußeren Schicht der Zona fasciculata und in der Zona glomerulosa auf.

Nach 3 Tagen etwa beginnt sich die Zona fasciculata zu verbreitern, während die Zona glomerulosa sich verschmälert. Der Lipoidgehalt der Zellelemente der mittleren Rindenschicht schwankt von einem Versuchstier zum anderen stark. 12 Tage post injectionem und in der folgenden Versuchszeit ist bei einzelnen Ratten die Ausbildung eines subcapsulären Blastems zu beobachten. Die Zona glomerulosa wird wieder breiter und nähert sich der Norm, während die Zona fasciculata nach wie vor verbreitert erscheint.

Diskussion

Die Verabreichung von 150 mg/kg Endoxan führt zu charakteristischen Veränderungen im Knochenmark und peripheren Blut der Ratte.

1. Erythropoese

In der ersten Stunde liegt die Erythroblastenzahl mit 55 % zunächst

über der Norm von 43 %. Da aber zu der gleichen Zeit der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten und Stabkernigen mit 16 % bzw. 5 % unter der Norm von 20,8 % bzw. 9,9 % liegt, handelt es sich nur um eine relative Vermehrung der Erythroblasten. Der zu diesem Zeitpunkt erhöhte Mitoseindex darf deshalb nicht als Zeichen einer gesteigerten Proliferation, sondern nur als Ausdruck einer Mitosearretierung gedeutet werden.

Ob die vorübergehend stark erhöhte Retikulozytenzahl des Blutes durch einen starken Ausschwemmungsreiz, der durch eine periphere Zerstörung der Erythrozyten durch Endoxan ausgelöst sein könnte, oder durch zentralnervöse Reize (30) auf Grund des Injektions- und Narkosetrauma zu erklären ist, sei dahingestellt.

Schon nach zwei wie auch in den folgenden Stunden nach der Injektion machen sich die ersten toxischen Schäden auch morphologisch an der Erythropoese bemerkbar. Der prozentuale Anteil der Erythroblasten liegt unter der Norm, und im peripheren Blut vermindert sich die Zahl der Retikulozyten. Da aber der Mitoseindex deutlich erhöht ist, und damit im Widerspruch zu den verminderten Erythroblasten steht, ergibt sich die Folgerung, daß Endoxan die Proliferation der Erythroblasten hemmt. Der verzögerte Ablauf der Mitosen ist Ausdruck der Zellschädigung. Da aber im Blut noch Retikulozyten auftreten, muß gefolgert werden, daß Endoxan die Ausreifung der Erythroblasten zu Retikulozyten nicht absolut beeinträchtigt.

Nach 24 Stunden verschwinden die basophilen und polychromatischen Erythroblasten aus dem Knochenmark. Die noch vorhandenen Normoblasten scheinen weiter auszureifen und ins Blut ausgeschwemmt zu werden, da noch einige Retikulozyten im Blut nachzuweisen sind. In der Phase der Markentleerung ist die Erythropoese vollständig eingestellt, der Retikulozytenwert 0 ‰. Die Erythrozytenzahl schwankt in der irritativen und aplastischen Phase im Normbereich. Erst mit Beginn der regeneratorischen Phase am 5. Tag sinkt die Erythrozytenzahl ab und erreicht am

8. Tag ihren niedrigsten Wert. Die Schädigung der Erythropoese macht sich also an der Zahl der Erythrozyten später bemerkbar und hinkt 5 Tage hinterher, was verständlich ist, wenn man bedenkt, daß die durchschnittliche Lebensdauer der Erythrozyten bei der Ratte 20 Tage beträgt. Mit Beginn der Regeneration setzt auch die Erythropoese wieder ein, und die Erythroblastenzahl erreicht am 7. Tag ihren Gipfel und überwiegt bei weitem die Leukopoese. Der Mitoseindex ist stark erhöht. Im Gegensatz dazu steht die niedrige Retikulozytenzahl. Diesen Befund kann man entweder so deuten, daß die Erythroblasten rasch proliferieren, oder eine lange Mitosedauer besitzen. Hyperbasophilie des Zellplasma und zunehmende Aktivität der sauren Phosphatase im Zytoplasma sprechen aber für die erste Möglichkeit, also für eine Proliferationssteigerung. Die Ausreifung der Erythroblasten ist allerdings gehemmt, so daß nur wenig Retikulozyten in die Blutbahn ausgeschwemmt werden.

Am 9. Tag drehen sich die Verhältnisse insofern um, als jetzt die Ausreifung die Proliferation überwiegt: Die Retikulozytenzahl steigt schlagartig an als Zeichen einer jetzt beginnenden verstärkten Ausschwemmung von ausgereiften Erythroblasten. Die Zahl der Normoblasten verringert sich, und der Mitoseindex bewegt sich im Bereich der Norm. Diese Phase, die durch ein Überwiegen der Ausreifungstendenz charakterisiert ist, wird am 14. Tag durch eine neue Entwicklung abgelöst, in der neben einer verstärkten Ausreifung sich eine vermehrte Proliferation bemerkbar macht und die schließlich zu einer Normalisierung der Erythrozytenzahl führt. Der Mitoseindex steigt wieder auf einen übernormalen Wert, der prozentuale Anteil der Normoblasten im Mark vergrößert sich und an Retikulozyten werden am 17. Tag exzessive Werte gefunden. Vom 26. Tag etwa an beginnt sich die Erythropoese und das periphere rote Blutbild zu normalisieren. Während der ganzen Versuchszeit konnte eine Ausreifungshemmung der Erythroblasten nicht beobachtet werden. Dies stimmt überein mit dem raschen Einbau von Fe 59 in die von Proliferation zur

Reifung umschaltenden Erythroblasten nach N-Lost-Behandlung beim Menschen (4).

Neutrophile Leukopoese

Irritative Phase:

Bereits nach 6 Stunden wird im Blut als Ausdruck einer Schädigung der Leukopoese eine Leukopenie beobachtet, wobei die Zahl der Leukozyten bis zum 3. Tag immer weiter abnimmt bis schließlich vom 3. bis zum 5. Tag praktisch keine leukozytären Elemente mehr im Blut nachweisbar sind. Das Verhältnis von neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten schwankt im Bereich der Norm. Nur nach 12 Stunden und 2 Tagen ist eine relative Granulozytose zu beobachten. Im Knochenmark nimmt die Prozentzahl der Segmentkernigen exzessiv zu, so daß das Differentialknochenmarksbild im Sinne einer Rechtsverschiebung verändert ist. Die Zahl der Mitosen liegt weit über der Norm. Beide Befunde, nämlich erhöhter Mitoseindex bei gleichzeitiger Rechtsverschiebung und Zellverarmung des Marks weisen auf einen Proliferationsstop auf der Stufe der Myelozyten mit einem verzögerten Mitoseablauf und Verhinderung des Mitoseeintritts im Knochenmark hin. Diese Vermutung wird auch durch die zytochemischen Befunde gestützt, für deren Deutung Pließ (43) folgende Regeln aufstellen konnte;

Der Lipoidgehalt wird bereits auf der Stufe der Myelozyten festgelegt und steht in enger Beziehung zur Stoffwechselaktivität und damit zur Proliferations- und Reifungspotenz. Je mehr Teilungsschritte nun zwischen den Myelozyten und den Reifkernigen zwischengeschaltet sind, um so mehr vermindert sich die histochemisch faßbare Lipoidmenge. Segmentkernige aber, die reichlich Lipoid enthalten, deuten darauf hin, daß entweder die Stoffwechselaktivität ihrer Mutter-Myelozyten beträchtlich gesteigert war oder daß Teilungsschritte ausblieben und die Reifung direkt vom Myelozyten zum Reifkernigen erfolgte. Anders verhalten sich dagegen Peroxydase, alkalische Phosphatase und Glykogen.

Peroxydase läßt sich zytochemisch bereits auf der Stufe des Promyelozyten erfassen, während alkalische Phosphatase und Glykogen erst beim Myelozyten auftreten. Gewöhnlich ist bei

einem normalen Knochenmark einer Ratte der Gehalt der Promyelozyten bzw. der Myelozyten an alkalischer Phosphatase, Peroxydase und Glykogen nur geringgradig. Erst beim Übergang vom Jugendlichen zum Stabkernigen fällt die zytochemische Reaktion auf alkalische Phosphatase deutlich positiv aus, während dieses für Glykogen erst beim Übergang vom Stab- zum Reifkernigen der Fall ist. Pließ (43) fand nun, daß der Gehalt an Peroxydase, alkalischer Phosphatase und Glykogen enger mit der Reifungsintensität verknüpft ist in dem Sinne, daß je intensiver die Stoffwechselaktivität der Myelozyten oder je länger der Reifungsweg bzw. die Differenzierungszeit ist, desto reicher die zytochemische Ausstattung des Segmentkernigen ist.

Wenn man diese zytochemischen Gesetzmäßigkeiten der Auswertung der Befunde zu Grunde legt, so kann man die von Stunde zu Stunde nach Versuchsbeginn reicher werdende zytochemische Ausrüstung der hypersegmentierten Jugendlichen und Reifkernigen besonders an Lipoiden nur so deuten: Schon sehr frühzeitig hemmt Endoxan den Mitoseeintritt der Myelozyten und Jugendlichen. Daher reifen diese mitosegehemmten leukopoetischen Zellen direkt ohne Zwischenschaltung von Mitosen zu Riesengranulozyten aus, wobei der Lipoidreichtum der Myelozyten nicht nur auf eine gesteigerte Reifungsintensität, sondern auch auf eine gesteigerte Mitosepotenz hindeutet. Diese Mitosepotenz kann aber nicht ausgenutzt werden, weil eben der Mitoseeintritt durch Endoxan gehemmt ist. Ein weiteres Indiz dafür, daß die Segmentkernigen sich direkt aus den Myelozyten entwickelt haben, ist ihre Zell- und Kernübergröße.

Die Riesengranulozyten sind außer mit Lipoiden reichlich mit alkalischer Phosphatase und Peroxydase ausgerüstet, was auf einen gesteigerten Zellstoffwechsel hinweist. Dieser Stoffwechselintensität paßt sich der Zellkern dadurch an, daß er sich durch Endomitose zum hypersegmentierten Riesenkern vergrößert (45).

Nach anderer Auffassung (5) soll die Kernübergröße allein durch RNS-Vermehrung bedingt sein. Riesengranulozyten treten aber auch nach anderen N-Lost-Derivaten auf (19). Nach BCM werden in Rattentumoren mehrkernige Riesenzellen beobachtet (32), die mindestens 50 % der Tumorzellen ausmachen. Die Mitosehemmung selbst ist eine allen N-Lost-Stoffen gemeinsame Wirkung (5, 19, 32).

Weiterhin ist aber auch die Ausreifung der neutrophilen Leukopoese

gestört. Dafür spricht die Basophilie und toxische Granulation der Promyelozyten und Myelozyten, die noch beim Jugendlichen nachzuweisen ist, und der überhöhte Gehalt der Stab- und Reifkernigen an Glykogen, alkalischer Phosphatase und Peroxydase.

Auch Stodtmeister (zitiert bei 28) hält die Vergröberung, die vermehrte Basophilie der Granulation und die persistierende Plasmabasophilie für ein Zeichen einer Ausreifungshemmung.

Aplastische Phase

In der Phase der Knochenmarksentleerung werden nur noch Riesengranulozyten beobachtet, die, wie ihre Größe und ihre exzessiv reiche zytochemische Ausrüstung verraten, letzte ausreifende Formen sind, die direkt von den Myelozyten und Jugendlichen herstammen. Jegliche Mitosetätigkeit ist erloschen.

Regeneratorische Phase

Auch in der regeneratorischen Phase ist die Leukopoese zunächst noch stark geschädigt. Die Regeneration setzt am 5. Tag mit einer starken Linksverschiebung auf der Stufe des Promyelozyten und Myelozyten ein. Der Mitoseindex ist stark erhöht. Er darf aber nicht allein in einer gesteigerten Mitosetätigkeit, sondern auch im Sinne eines verlangsamten Mitoseablaufes gedeutet werden, denn die Myelozyten enthalten zunächst nur wenig Lipoide, was darauf hindeutet, daß ihr Mitosestoffwechsel noch nicht normalisiert ist. Die neutrophilen Jugendlichen, Stab- und Segmentkernigen sind dagegen reichlich mit Peroxydase und alkalischer Phosphatase ausgerüstet. Es ist daher zu vermuten, daß die mitosegehemmten Myelozyten und Jugendlichen direkt zu Segmentkernigen ausreifen, wobei die Ausreifung etwas verzögert abläuft. Auch die Ausreifungsanomalien bestätigen diese Vermutung. So finden wir Plasmahyperbasophilie, Kernübergröße, Hypersegmentierung und toxische Granulation. Die ersten Granulozyten werden im Blut am 6. und 7. Tag nachgewiesen. Offenbar werden die neutrophilen Elemente,

die das Reifungsstadium des Segmentkernigen erreicht haben, sofort in das Blut ausgeschwemmt. Vom 7., 8. Tag nimmt der Lipoidgehalt der Myelozyten und damit die Mitosepotenz zu. Eine beginnende Normalisierung des Mitoseablaufes zeichnet sich schließlich ab 9. Tag ab.

Es lassen sich deutlich zwei Zellgenerationen unterscheiden, die einen unterschiedlichen Gehalt an Lipoiden und Peroxydase aufweisen und die zwei Zellreihen repräsentieren, von denen die einen Zellen einen noch gestörten, die anderen einen etwa normalen Mitosestoffwechsel zeigen. Diejenigen Zellen, die vermehrt Lipoide und Peroxydase enthalten, sind noch toxisch geschädigt: Ihr Mitosestoffwechsel ist wahrscheinlich im Sinne einer Verlangsamung des Mitoseablaufes verändert. Ihre Ausreifung ist verzögert und beansprucht eine längere Differenzierungszeit.

Morphologisch fallen diese Zellen durch ihre Ausreifungsanomalien auf wie: Zell- und Kernübergröße, toxische Granulation und Plasmahyperbasophilie. Sie gehören also der oben beschriebenen ersten regenerierenden Zellgeneration an.

Anders verhält es sich bei der 2. Zellgeneration, deren Jugendliche, Stab- und Reifkernige nur eine normale oder subnormale Menge an Peroxydase und Lipoiden enthalten. Diese Zellen lassen vermuten, daß ihre Differenzierungszeit dadurch verkürzt wird, daß auf ihrem Reifungsweg auf der Stufe des Myelozyten und Jugendlichen Mitosen eingeschaltet werden. Die Differenzierungsgeschwindigkeit dieser hyperplastisch proliferierenden, in ihrem Mitosestoffwechsel nicht geschädigten Zellgeneration, ist beschleunigt, so daß der einzelne, ausgereifte Granulozyt sich nur wenig mit Peroxydase und alkalischer Phosphatase ausrüsten kann.

Zytomorphologisch fehlt diesen Zellen, wie oben beschrieben, die toxische Granulation, und die Zellkerne zeigen nur geringe Tendenz zur Hypersegmentierung. Sie sind also Abkömmlinge der neuen hyperplastischen Generation. Außer diesen histochemischen und zytomorphologischen Befunden gibt auch die prozentuale Auswertung

des Knochenmarks einen Hinweis auf die beschleunigte Ausreifung der leukopoetischen Zellen: Vom 8. bzw. 9. Tag nämlich nimmt der prozentuale Anteil der Promyelozyten, Myelozyten, Jugendlichen und Stabkernigen ab, was auf eine beschleunigte Differenzierung dieser Zellelemente zu Segmentkernigen zurückzuführen ist.

Zur gleichen Zeit kommt es im Blut zu einer absoluten Granulozytose durch eine vermehrte Ausschleusung von ausgereiften Reifkernigen. Auch in der Folgezeit stehen im Knochenmark zwei Zellgenerationen mit unterschiedlicher zytochemischer Ausrüstung nebeneinander. Dabei ist aber zu erwähnen, daß auch die hyperplastische Reihe gegen Ende der Versuchszeit zytochemisch reicher ausgerüstete Ausreifungsformen zeigt, die ihre erhöhte Enzym-, Lipoid- und Glykogenbeladung der gesteigerten Stoffwechselaktivität der Myelozyten verdanken.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß bei Endoxangabe deutlich eine Früh- von einer Spätwirkung zu unterscheiden ist. Die Frühschädigung ist gekennzeichnet durch eine Reifungsverzögerung, Verzögerung des Mitoseablaufs, Verhinderung des Mitoseeintritts und Zytodegeneration, während die Spätwirkung durch nachwirkende Verzögerung der Ausreifung, verlängerte Mitosedauer und Reifungsanomalien charakterisiert ist.

Auch Droste und Mitarbeiter (16) untersuchten die Wirkung von Endoxan auf das Knochenmark der Ratte.

Sie verabreichten Ratten 100 mg/kg Endoxan und fanden eine konstante Leuko- und Thrombozytopenie am 5. - 6. Tag mit relativer Lymphozytose im peripheren Blut. Im Knochenmark überwiegen zur gleichen Zeit die granulopoetischen Jugendformen mit bevorzugtem Auftreten von Promyelozyten und Myelozyten, während die Granulozyten fast völlig fehlen. Der Knochenmarksfunktionstest mit Lipopolysaccharidinjektion führt zu keiner vermehrten Ausschwemmung von Leukozyten. Diese Befunde werden so gedeutet, daß Endoxan die Granulopoese im Sinne einer Reifungsstörung mit gleichzeitiger Ausschwemmungssperre schädigt. Daneben steht eine gesteigerte Knochenmarksproliferation. Auch wir fanden zu dem gleichen Zeitpunkt bei subletalen Dosen von Endoxan eine Reifungsstörung der

Granulopoese und Proliferation der Promyelozyten und Myelozyten mit allerdings verzögertem Mitoseablauf.

Wenn man die Schädigungen des Knochenmarks durch Endoxan mit denen durch N-Lost und seine Derivate vergleicht, soweit das überhaupt in Anbetracht der verschiedenen Versuchsbedingungen und Versuchstiere möglich ist, so ergibt sich eine gewisse Übereinstimmung mit N-Lost.

Graef und Mitarbeiter (23) beobachteten, wie bereits erwähnt, daß nach Verabreichung von letalen Dosen von N-Lost an Kaninchen 8 - 30 Stunden post injectionem degenerative Veränderungen am Knochenmark auftreten: Es kommt zur Schwellung und Auflösung der Knochenmarkszellen, zur Alteration ihrer Färbung und zum Auftreten großblasiger Kerne. Mitosen sind bis zu 8 Stunden post injectionem zu sehen und fehlen danach völlig bis zur Regenerationsphase. Die Megakaryozyten zeigen konstant bizarre Schwellungen, während die retikulären Elemente unverändert bleiben. Nach dieser Alterationsphase schließt sich zwischen der 40. und 90. Stunde eine komplette Aplasie an. Alle hämatopoetischen Zellen verschwinden. Die im Knochenmark zurückbleibenden Zellen sind Endothelien, Retikulumzellen, Fibrozyten, wenige Makrophagen und Fettzellen. Nach 4 - 5 Tagen setzt die Regeneration mit einer starken Linksverschiebung mit reicher Mitoseaktivität an.

Im Gegensatz dazu treten nach subletalen Gaben von Endoxan bereits nach 1 Stunde die ersten Anzeichen einer Knochenmarksschädigung auf. Auch werden Mitosen bis zum 1. Tag nach Versuchsbeginn gefunden, während die Phase der Markaplasie und der Beginn der Regeneration weitgehend mit der Endoxanwirkung übereinstimmen.

Elson (19) untersuchte Chlorambucil, einen N-Lost-Abkömmling, an Albinoratten und fand, daß bereits nach 48 Stunden eine totale Markentleerung auftritt, an die sich aber sofort eine Regenerationsphase anschließt. Bei Endoxan dagegen enthält das Knochenmark am 3. Tag keine hämatopoetischen Zellen mehr, und die Regeneration setzt erst am 5. Tag ein. Elson (19) beobachtete auch Riesengranulozyten. Ihre Bildung deutet er in Übereinstimmung mit uns so, daß es sich um Zellen handelt, die zum Zeitpunkt der Exposition gegenüber Chlorambucil in die Syntheseperiode eintreten. Sie führen ihre Chromatinsynthese durch, sind aber mitoseunfähig, so daß aus ihnen Riesenpromyelozyten entstehen, die weiter ohne Teilung zu Riesenneutrophilen reifen.

Nachhaltige Reaktionen auf Endoxangabe sind aber nicht nur am

Knochenmark, sondern auch an Milz, Leber, Magen, Duodenum und Nebennieren nachweisbar. Ab 18 Stunden nach Versuchsbeginn verkleinern sich die Milzfollikel und ihre retothelialen Scheiden werden schmal. Damit korrespondiert auch eine starke Abnahme der absoluten Lymphozytenzahl im peripheren Blut, die rascher als bei den Granulozyten vor sich geht. Die sich zwischen dem 3. und 5. Tag anschließende relative Lymphozytose dürfte durch eine im Vergleich zu den Granulozyten längere Überlebenszeit der restlichen Lymphozyten bedingt sein. Die ersten größeren Milzfollikel treten etwa vom 6. Tag wieder auf. Gleichzeitig grenzen sich auch die Follikelscheiden deutlicher von der roten Pulpa ab. Damit im Einklang steigt die absolute Zahl der Lymphozyten im peripheren Blut an, um gegen Ende der Versuchszeit die untere Normgrenze zu erreichen.

Bei der Testung von Chlorambucil (19) an Albinoratten sind die Follikelscheiden erst nach 48 Stunden verschwunden. Auch der Lymphozytenabfall im peripheren Blut ist geringer und beträgt 10 % des Initialspiegels, während bei Endoxan so gut wie keine Lymphozyten im Blut mehr nachweisbar sind. Die Lymphozytenregeneration setzt dann bei Chlorambucilgabe bereits am 3. Tag ein, wobei die Regeneration allerdings schleppend vor sich geht.

Auch Pillers (41) beobachtete, daß die Therapie mit Chlorambucil (Leukeran) beim Menschen depressorisch auf das lymphatische Gewebe wirkt. Die spezifische Reaktivität auf einen entsprechenden Reiz ist aber dabei nicht eingeschränkt, da es bei akzidentellen Virusinfekten zu einem temporären Anstieg der Lymphozyten kommt. Nemeth (39) stellte fest, daß BCM (1,6-bis-(β-chloräthylamino)-1,6-desoxy-D-mannit-dichlorhydrat), Mitomen und Phenylalaninlost zuerst die Lymphopoese hemmen und dann erst die Eosinophilen-Granulozyten-Monozyten-Thrombozyten und Erythrozyten der Reihe nach schädigen.

Endoxan dagegen hemmt - zumindest bei einer subletalen Dosis gleichmäßig sowohl die Granulo- wie auch Lymphopoese. Immerhin scheint allen N-Lostderivaten die toxische Wirkung auf das lymphatische Gewebe gemeinsam zu sein.

Vom 1. Tag post injectionem bildet die Milz keine Reaktionszentren mehr. Damit korrespondieren in etwa die vom 1. bzw. 3. Versuchstag fehlenden histiozytären und leukozytären Infiltrate

der Niere und der Mukosa des Magens und des Duodenum. Die Schleimhaut verliert offensichtlich unter Endoxaneinwirkung die Fähigkeit, auf exogene Einflüsse mit "entzündlichen" Gewebsproliferationen zu reagieren, weil einerseits eine Agranulozytose besteht, andererseits vielleicht die Fibroblastenwucherung gehemmt ist. Erst etwa vom 9. Tag bzw. 10. Tag post injectionem treten in der Duodenal- bzw. Magenschleimhaut histio- und leukozytäre Infiltrate auf, während bei der Milz die ersten Reaktionszentren 12 Tage nach Versuchsbeginn wieder beobachtet werden.

Bei den geschrumpften Leukozyten, die in den Maschen der roten Pulpa nach 6 - 12 Stunden angehäuft gefunden werden, handelt es sich sicherlich um geschädigte Leukozyten des peripheren Blutes, die von der Milz abgefangen und dort an Ort und Stelle abgebaut werden. Da der starke Leukozytenabfall im peripheren Blut nicht allein durch Einstellung der Leukopoese zu erklären ist, spricht dieser Befund für einen beschleunigten Untergang der im Blut kreisenden Zellen. Auch die bis zum 6. Tag zunehmende Eisenspeicherung in den Lymphfollikeln und in der roten Pulpa spricht für einen gesteigerten Abbau von wahrscheinlich geschädigten Erythrozyten in der Milz. Bemerkenswert ist nun, daß vom 6. Tag post injectionem erst einzelne, dann multiple Kupffersche Sternzellen der Leber Eisen zu speichern beginnen, während gleichzeitig der Eisengehalt der Milzpulpa und -follikel abnimmt. Man könnte diese Befunde so deuten, daß mit Beginn der Knochenmarksregeneration am 5. Tag die Milz an das Knochenmark reichlich Eisen über die Milzvene und Pfortader abgibt, wobei ein Teil des Eisens von den Kupfferschen Sternzellen abgefangen wird.

Die Endoxanwirkung auf die blutbildenden Zellen ist nicht nur im Knochenmark, sondern auch in den extramedullären Herden zu beobachten. Die Erythro- und Leukopoese nimmt in der Leber und in der Milz kontinuierlich ab, bis schließlich am 1. Tag post injectionem keine Blutbildungsherde mehr nachweisbar sind. Im

Knochenmark finden sich dagegen zu diesem Zeitpunkt noch Riesenstab- und Segmentkernige.

Die extramedullären Blutbildungsherde sind also offensichtlich etwas empfindlicher als das Knochenmark gegenüber Endoxaneinwirkung, was vielleicht zum Teil dadurch erklärt werden könnte, daß der Nachschub an blutbildenden Zellen aus dem Knochenmark auf Grund der Markschädigung eingestellt ist. Die Regeneration der extramedullären Blutbildung setzt in den Follikelscheiden der Milz am 5. Tag mit der Leukopoese ein. In der Leber beginnt die Blutbildung etwa 2 Tage später, wobei basophile Zellelemente, die vermutlich aus dem Knochenmark eingeschwemmt sind, in den Sinus auftreten. In der folgenden Versuchszeit ist eine überschießende Blutbildung in der Milzpulpa, in den Follikeln, in den periportalen Feldern und in den Läppchen der Leber zu beobachten.

Merkwürdig sind allerdings die einzelnen großen intraazinären Infiltrate von granulomartigem Charakter mit Schwund der Leberzellen, die sowohl vor der aplastischen Phase als auch in der Regenerationsphase bei mehreren Ratten auftreten. Sie enthalten teils Histiozyten mit lockeren gekerbten Kernen, teils Riesengranulozyten, teils kleine Leukozyten. Da zur gleichen Zeit die Kupfferschen Sternzellen stark geschwollen sind, ergibt sich die Frage, ob nicht etwa die Sternzellen ohne Zwischenschaltung einer myelozytären oder metamyelozytären Phase zu Riesengranulozyten reifen. Die normal großen Granulozyten wären dann Abkömmlinge kolonisierter Markzellen, die den üblichen Reifungsweg durchlaufen. Ob der Leberzelluntergang lediglich durch die Zellproliferation zustande kommt, oder ob hier noch eine infektiöse Noxe für die Entstehung der Granulome und des Parenchymunterganges verantwortlich ist, muß offen bleiben.

Beim Vergleich des Ausmaßes der Schädigung der extramedullären Blutbildung in der Milz durch Chlorambucil (10) ergibt sich weitgehende Übereinstimmung: Die granulopoetischen Herde sind nach

24 Stunden post injectionem an Größe und Zahl reduziert und während des 2. und 3. Tages nicht zu identifizieren. Sie treten dann nach 8 Tagen wieder in Erscheinung.

Bei der Auswertung der Knochenmarksschnitte ergibt sich, daß Endoxan auch eindeutig die Megakaryozyten schädigt. Die letzten Megakaryozyten sowohl im Knochenmark als auch in der Milz sind bis zum 1. Tag post injectionem nachweisbar. Damit stimmt ein kontinuierlicher Thrombozytenabfall im peripheren Blut überein, der am 5. Tag mit 40.000 Thrombozyten seinen niedrigsten Wert erreicht. Die ersten Megakaryozyten treten mit dem Beginn der allgemeinen Regeneration im Knochenmark am 5. Tag wieder auf, während sie im Milzparenchym erst 2 Tage später nachweisbar werden. Damit korrespondiert ein "treppenförmiger" Anstieg der Blutthrombozyten.

Bemerkenswert ist noch, daß es im Beginn der Regeneration der Blutzellen zu einer Endost- und teilweise zu einer Osteoblastenwucherung kommt. Da die ersten leukozytären Elemente in unmittelbarer Nachbarschaft des Endost auftreten, so ist in Anbetracht der hochgradigen Schädigung des Knochenmarks zu vermuten, daß die Leukopoese teilweise von primitiven endostalen Zellelementen ausgeht. Wie weit die Osteoblasten bzw. ihre indifferenten Vorstufen sich hämatopoetisch betätigen, sei dahingestellt.

Bei der Schilderung der histologischen Veränderungen der Nebennierenrinde wurde darauf hingewiesen, daß es in den ersten 2 Tagen zu einer akuten Lipoidentspeicherung der Zellen der Zona fasciculata kommt. Dieser Befund kann so gedeutet werden, daß die Versuchstiere unter der Einwirkung einer Stress-Belastung stehen, die zu einer vermehrten Ausschüttung von Glukocorticoiden der Nebenniere führt. Vom 3. Tag post injectionem verbreitert sich die Zona fasciculata im Sinne einer progressiven Transformation auf Kosten der Zona glomerulosa, wobei allerdings nur wenige Mitosen zu beobachten sind. Vom 12. Tag an ist außerdem ein

subcapsuläres Blastem als Zeichen der progressiven Transformation nachweisbar. Die Transformation der Fasciculata ist sicherlich eine Akkomodationserscheinung der Nebennierenrinde an die Wirkungen der schweren Endoxan-Intoxikation. Wie weit Endoxan eine indirekte Wirkung über das ZNS und Endokrinium ausübt, ist durch unsere Untersuchung nicht zu beantworten.

Zusammenfassung

54 jungerwachsenen Ratten wurde eine einmalige Dosis von 150 mg/kg Endoxan intraperitoneal injiziert. Von den 44 überlebenden Tieren wurden je 2 (ein Männchen und ein Weibchen) nach bestimmten Zeitabschnitten getötet. Es wurden die Zahl der korpuskulären Elemente des peripheren Bluts bestimmt und ein Blut- und Knochenmarksdifferentialbild angefertigt. An Knochenmarksausstrichen wurden der Mitoseindex bestimmt und die zytomorphologischen Veränderungen beurteilt. Außerdem wurden zytochemische Reaktionen an Knochenmarksausstrichen zum Nachweis von alkalischer und saurer Phosphatase, Peroxydase, Lipoiden und Glykogen angestellt. Zahlreiche Körperorgane wurden einer histologischen Untersuchung unterzogen.

Als wesentliches Ergebnis wurde eine charakteristische Schädigung der Erythro- und Leukopoese gefunden. Dabei ließ sich deutlich eine Früh- von einer Spätwirkung abgrenzen. Die Frühwirkung war durch Verhinderung des Mitoseeintritts, durch eine Verlängerung der Mitosedauer, Zytodegeneration und Reifungsstörung gekennzeichnet, während die Spätwirkung durch Ausreifungsverzögerung, verlängerte Mitosedauer und Reifungsanomalien charakterisiert war. Außerdem wurde eine eindeutige Megakaryozytenschädigung beobachtet.

An den übrigen Organen wurden noch folgende Endoxanwirkungen gefunden: Länger andauernde, hochgradige Hemmung der extramedullären Blutbildung in der Milz vom 1. bis zum 5. Tag post injectionem und in der Leber vom 1. bis zum 7. Tag mit anschließender, überschießender Regeneration der extramedullären Blutbildungsherde. Die histio- und leukozytären Infiltrationen der Magen- und Duodenalschleimhaut fehlten vom 3. bis zum 10. bzw. 9. Tag. Der Haemosideringehalt der Milz nahm bis zum 8. Tag kontinuierlich zu, verringerte sich dann wieder bei gleichzeitiger zunehmender Eisenspeicherung der Kupfferschen Sternzellen und Fibrozyten der periportalen Felder der Leber. An der Nebennierenrinde konnte eine deutliche Stressreaktion nachgewiesen werden.

Literaturverzeichnis

1. Arnold, H., F. Bourseaux, N. Brock
Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518 - Asta) in experimental tumours of the rat
Nature 181, 931 (1958)

2. Becker, Th.
Zur Indikationsbreite des N-oxyd-Lost bei der Behandlung maligner Tumoren.
Krebsforsch. Krebsbekämpfung 2, 279 (1957)

3. Bernard, J., G. Mathé, M. Weil
Die Behandlung der Lymphogranulomatose, der chronischen lymphatischen Leukämien und der Lymphosarkome mit P-(di-2-chlor-P äthylamino) -phenyl-buttersäure.
Blut 3, 229 (1957)

4. Bertinchamps, A., Y. Kenis, H.J. Tagnon, T. Peltzer
The effect of HN2 on hemoglobin synthesis by avian erythrocytes in vitro
Cancer (Philadelphia) 11, 996 (1958)

5. Bodenstein, D.
Effects of radiomimetic substances on embryonic development with special reference to nitrogen mustards.
J. cell. a. compar. Physiol.
43, Suppl. 1, 179, (1954)

6. Borison, H. L., E. D. Brand, R. K. Orkand
Emetic action of nitrogen mustard (mechlorethamine Hydrochloride) in dogs and cats.
Am. J. Physiol. 192, 410 (1958)

7. Brichta, G., J. Kühböck, E. E. Reimer
Klinische Erfahrungen mit N-Lost-Phosphamid-estern bei Hämopathien
Wien. Z. inn. Med. 39, 306 (1958)

8. Brin, M., R. W. McKee
Effects of x-irradiation, nitrogen mustard, fasting, cortisone and adrenalectomy on transaminase activity in the rat.
Arch. Biochem. Biophys. (N.Y.) 61, 384 (1956)

9. Brock, N.
Zur pharmakologischen Charakterisierung zyklischer N-Lost-Phosphamidester als Krebs-Chemotherapeutika
Arzneimittelforschg. 8, 1 (1958)

10. Cardinali, G., G. Caprino, N. Piscitelli
Compartamento della reazione di Hotchkiss nel danno epatico provocato sperimentalmente con alcune sostanze antimotiche
Tumori (Milano) 40, 176 (1954)

11. Chury, J.
Modifikation der histologischen und hämatologischen Veränderungen bei Ratten nach Gaben von Trichlortriäthylamin-Hydrochlorid-Lösungen durch Äthernarkose
Experientia 12, 70 (1956)

12. Cohn, P.
The distribution of radioactivity in tissues of the rat following the administration of a nitrogen mustard derivative (P-di-(2-chloroethyl) amino-DL-phenyl ($\beta^{14}C$) alanine)
Brit. J. Cancer 11, 258 (1957)

13. Diamant, H.
The toxic action of some compounds on the inner ear and its central vestibular connections.
Arch. Otolar. 67, 546 (1958)

14. Dohi, S. R., M. Rabinovitch
Post nephrectomy increase in serum ribonuclease activity after total hepatectomy or nitrogen mustard derivates administration
Experientia (Basel) 13, 358 (1957)

15. Donaldson, D., M. L. Miller
Depression on normal serum bactericidal activity by nitrogen mustard
J. Immunol. 82, 69 (1959)

16. Droste, R., E. Dorszewski, E. Koch
Untersuchungen zur Frage der toxischen Blutschäden bei der Ratte durch hochdosierte zyklische N-Lost-Phosphamidester
Aerztl. Forschg. 13 (1) 1959

17. Drysdale, R. B., A. Hopkins, R. Y. Thomson, R.M.S. Smellie, J. N. Davidson
Some effects of nitrogen and sulphur mustards on the metabolism of nucleic acids in mammalian cells
Brit. J. Cancer 12, 137 (1958)

18. Dubois, K. P., D. F. Petersen, G. R. Zins
Phosphatase activity of hematopoietic tissues of nitrogen mustard-treated Animals
Proc. Soc. exp. biol. Med. 91, 244 (1956)

19. Elson, L. A., D. A. G. Galton, M. Till
The action of chlorambucil (C. B. 1348) and Busulphan (Myleran) on the haemopoietic organs of the rat
Brit. J. Haematol. 4, 355 (1958)

20. Ernst, H., H. W. Rathenow, H. J. Eichhorn
Untersuchungen mit der P^{32} Indikatormethode über die Hemmwirkung von N-Oxyd-Lost (Mitomen) auf Walker-Carcinom- und Normalgewebe der Ratte
Acta biol. med. germ. 1, 101 (1958)

21. Gaertner, H.
Die antiphlogistische, antiallergische und heilungsfördernde Wirkung des Stickstofflostes und ihre therapeutische Ausnutzung
Z. ges. inn. Med. 12, 426 (1957)

22. Girelli, M., P. M. Carrara
Modificazioni citochimiche delle cellule emopoietiche consecutive all' impiego sperimentale di Prednisone, Prednisolone ed azoipriti
Haematologica (Pavia) 43, 33, (1958)

23. Graef, J., D. A. Karnofsky, V. B. Jager, B. Krichesky, H. W. Smitz
The clinical and pathologic effects of the nitrogen and sulfur mustards in laboratory animals.
Am. J. Pathol.
24, 1 (1948)

24. Green, D. M.
The effects of nitrogen mustard (Methyl bis (ß-chlorethyl) amine HCl) on the immunological response of the rabbit
Brit. J. exper. Path. 39, 192 (1958)

25. Groß, R., Kl. Lambers
Erste Erfahrungen in der Behandlung maligner Tumoren mit einem neuen N-Lost-Phosphamidester
Dtsch. med. Wschr. 83, 458 (1958)

26. Grupper, Ch., A. Commissionat
Leucémides polymorphes au cours d'une leucémie lymphoide chronique. Résultats immédiats favorables du chloraminophène.
Bull. Soc. Dermatol. Syphil.
64, 135 (1957)

27. Harold, F. M., Z. Z. Ziporin
The Relationship between the Synthesis of DNA and Protein in Echerichia coli treated with Sulfur Mustard
Biochem. Biophys. Acta
28, 492 (1958)

28. Henne, H. F., W. Marggraf
Klinische Erfahrungen und experimentelle Untersuchungen mit dem Zytostatikum N-Oxyd-Lost in der Chirurgie
Krebsforschg. Krebsbekämpfung 2, 281 (1957)

29. Hirschberg, E., A. Gellhorn, W. C. Gump
Laboratory Evaluation of a New Nitrogen Mustard, 2 (Di-(2-chlorethyl) aminomethyl) benzimidazole, and of other 2-Chlorethyl Compounds
Cancer Res. 17, 904 (1957)

30. Hoff, F.
Klinische Physiologie und Pathologie
Georg Thieme Verlag/Stuttgart 1957

31. Jacobson, L. O., E. K. Marks, E. Gaston, M. H. Block
The effects of nitrogen mustard on induced erythroblastic hyperplasia in rabbits
J. labor clin. Med. 34, 902 (1949)

32. Kellner, B., L. Nemeth, C. Sellei
Results of recent experiments with BCM.
Giorn. Ital. Chemioterapia 3, 352 (1956)

33. Krakoff, J. H., D. A. Karnofsky, J. H. Burchenal
Remissions induced by chlorambucil in chronic granulocytic leukemia
J. am. med. Assoc. 166, 629 (1958)

34. Magalini, S. J., E. K. Pillers
Hematological changes following treatment with P-(Di-2-chlorethylamino) -phenylblutyric acid (CB 1348) in cancer
Cancer (Philadelphia) 11, 416 (1958)

35. Miller, Z. Influence of Ethylenimine Structure on the Oxidation of Choline, Formaldehyde, and Sarcosine
Arch. Biochem. Biophys. (N.Y.) 47, 137 (1953)

36. Miller, Z.
Effect of Methyl-bis-(Beta-chlorethyl) amine on Aerobic Glycolysis of Thymus Lymphocytes
Proc. Soc. exper. biol. Med. 87, 170 (1954)

37. Mutolo, V., F. Abrignani
Inibizione dell' attività catalasica da 2,2 dicloro-N-metildietilamina cloridrato
Oncologia 7, 61 (1954)

38. Narpozzi, A.
Influenza dell' azoiprite sull' attivita macrofagica nel topo.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim.
31, 26 (1955)

39. Nemeth, L., K. Lapis
Vergleichende Untersuchungen mit neueren alkylierenden Substanzen an Tierkrebsen.
Arzneimittelforschung 8, 340 (1958)

40. Obrecht, P.
Neuere Zytostatica
Dtsch. Med. Wschr. 82, 2147 (1957)

41. Pillers, E. K., S. J. Magalini
Hematological changes following treatment with P-(Di-2-chlorethylamino)-Phenylbutyric acid (CB 1348) in cancer
Cancer (Philadelphia) 11, 410 (1958)

42. Pließ, G.
Wirkungen der Cytostatica auf die Zahnentwicklung der Albinoratte
III Mitteilung: Morphologische Veränderungen an den Incisoren der erwachsenen Ratte nach Aminopterin, Colcemid, E 39 und B 518 Asta
Frankf. Z. Path. 69, 437 (1958)

43. Pließ, G.
Zytochemische Befunde am Knochenmark der Ratte nach experimenteller Myelophthise.
Verh. dtsch. Ges. Path. 42, 400 (1959)

44. Preussmann, R.
Chlor-Abspaltbarkeit und Wirksamkeit bei N-Lost-Verbindungen
Arzneimittelforschung 8, 638 (1958)

45. Rohr, K.
Das menschliche Knochenmark.
Georg Thieme Verlag/Stuttgart 1949

46. Santamaria, R., G. Giordano
Effetto del bis-(2-chloretil) metilamina cloridrato sulle proteine del siero
Boll. Soc. Ital. Biol. sperim. 33, 1237 (1957)

47. Sato, H., M. Belkin, E. Essner
Effect of nitromin on mitosis and cytoplasmic volume in the cells of two mouse ascites tumours.
J. Nat. Cancer Inst. 17, 421 (1956)

48. Scheuer-Karpin, R.
N-Lost als entzündungshemmendes Mittel
Z. ärztl. Fortbildg. 50, 978 (1956)

49. Schmidt, L., F. Schennetten
Zur klinischen Toxikologie des Stickstofflostes
Zschr. ges. inn. Med. 11, 477 (1956)

50. Scholtissek, C.
Einwirkung von Stickstofflost, seinem N-Oxyd, Colchicin und Röntgenstrahlen auf Nukleinsäuren und deren Bausteine
Z. Krebsforschg. 61, 578 (1957)

51. Schröder, M.
Zur Wirkung des Cytostaticum Triäthylenmelamin (TEM) auf Knochenmark und Ratte
Inaugural-Dissertation Hamburg 1960

52. Sellei, C., Z. Antalóczy
Über den Wirkungsmechanismus der Lostverbindungen unter besonderer Berücksichtigung von BCM, einer neuartigen zellteilungshemmenden Substanz.
Wiener Z. inn. Med. 37, 337 (1956)

53. Spain, D. M.
Rapid and extensive development of amyloidosis in association with nitrogen mustard therapy.
Am. J. clin. Path. 26, 52 (1956)

54. Stubblefield, E., T. C. Hsu
Effect of Phenylalanine nitrogen mustard on tissues in culture
Antibiotics a. Chemotherapy 7, 493 (1957)

55. Teilum, G.
Studies on pathogenesis of amyloidosis II.
Effect of nitrogen mustard in inducing amyloidosis
J. labor. clin. Med. 43, 367 (1954)

56. Trams, E. G., C. T. Klopp
Distribution of radiocarbon in liver choline, creatine and methionine after the injection of methyl-C^{14}-bis(ß-chlorethyl) amine
Cancer Res. 15, 617 (1955)

57. Trams, E. G.
Studies on role of liver in nitrogen mustard detoxication
Proc. soc. exper. biol. Med. 99, 133 (1958)

58. Vasterling, H. W., E. Halfpap
Klinische Erfahrungen und experimentelle Untersuchungen mit dem Zytostatikum N-Oxyd-Lost in der Gynäkologie.
Krebsforschg. Krebsbekämpfung 2, 283 (1957)

59. Wachstein, M.
Histochemistry of leukocytes
Ann. N.Y. Acad. Sci. 59, 1052 (1955)

60. Wheeler, G. P., J. S. Morrow, H. E. Skipper
Studies with mustards. I. Ion-exchange chromatography of reaction mixtures of purines and pyrimidines with nitrogen mustard.
Arch. Biochem. Biophys. (N.Y.) 57, 124 (1955)

61. Wheeler, G. P., H. E. Skipper
Studies with mustards. III. In vivo fixation of C^{14} from nitrogen mustard - $C^{14}H_3$ in nucleic acid fractions of animal tissues
Arch. Biochem. Biophys. (N.Y.)
72, 465 (1957)

Nachwort

Herrn Privatdozent Dr. med. G. Pliess danke ich aufrichtig für die freundliche Überlassung des Themas und für die mir allezeit gewährte Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. C. Krauspe, Direktor des Pathologischen Institutes der Universität Hamburg, für die Einräumung des Arbeitsplatzes.

Fräulein U. Eddelbüttel danke ich für die Mithilfe bei der Herstellung der mikroskopischen Präparate.

Den Asta-Werken, Brackwede, danke ich für die Überlassung des Präparates Endoxan.

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Lebenslauf

Am 30. März 1934 wurde ich in Itzehoe als Sohn des Ingenieurs Joseph Faßbender und seiner Ehefrau Emmy geb. Bamberg geboren.

Vom 6. bis zum 10. Lebensjahr besuchte ich eine Itzehoer Volksschule und von 1946 das Staatliche humanistische Gymnasium in Itzehoe, an welchem ich 1955 die Reifeprüfung bestand.

Ab 1955 studierte ich an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Medizin. 1957 bestand ich das Physikum. Nach einem weiteren klinischen Semester in Kiel setzte ich 1958 mein klinisches Studium an der Universität Hamburg fort.

Januar 1961 schloß ich mein Medizinstudium mit dem Staatsexamen ab.

Druck: Photo-Copie GmbH Hamburg 1